

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА  
Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота  
бакалавра**

*на тему: «Антифунгальна активність штамів лактобактерій  
з Чорного моря та їх біотехнологічний потенціал»*

*Antifungal activity of the strains of lactobacteria from Black sea and  
their biotechnology potential*

**Виконала:** студентка IV курсу  
денної форми навчання  
Спеціальність 162 Біотехнології та  
біоінженерія  
**Кімуржий Ірина Іванівна**

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

Голова ЕК  
\_\_\_\_\_ **Іваниця В.О.**  
(підпис) (прізвище та ініціали)

## АНОТАЦІЯ

Проведено дослідження антифунгальної активності тринадцяти ізолятів лактобактерій з води Чорного моря та мідій методом дифузії в агар.

У результаті вісім ізолятів з морської води (МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, В.2.3, В.2.4) та один ізолят, виділений з ліквору мідій (МКБ М.4.1), повністю пригнічували ріст міцелію та спороутворення *Penicillium expansum* УКМ F-575 та *Aspergillus niger* УКМ F-16706 упродовж семи днів. Висока антифунгальна активність нових ізолятів лактобактерій свідчить про можливість їх потенційного використання у різних галузях біотехнології.

Роботу викладено на 48 сторінках, вона містить 2 таблиці та 9 рисунків. Наведено посилання на 95 джерел літератури (4 кирилицею та 91 латиницею).

**Ключові слова:** *антифунгальна активність, гриби, мідії, молочнокислі бактерії, Чорне море.*

A study of the antifungal activity of thirteen isolates of lactobacilli from the Black Sea water and mussels using the agar diffusion method was conducted.

As a result, eight seawater isolates (LAB W.1.1, W.1.2, W.1.3, W.1.4, W.1.5, W.1.дк, W.2.3, W.2.4) and one mussel liquor isolate (LAB M4.1) completely inhibited mycelial growth and sporulation of *Penicillium expansum* UKM F-575 та *Aspergillus niger* UKM F-16706 within seven days. The high antifungal activity of new isolates of lactobacteria indicates a possibility of their potential use in various fields of biotechnology.

Diploma is expounded on 48 pages, it contains 2 table and 9 figures. It provides links to 95 references (4 cyrillic and 91 latinic).

**Key words:** *antifungal activity, fungi, mussels, lactic acid bacteria, Black Sea.*

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Характеристика молочнокислих бактерій з морських джерел.....	7
1.2. Метаболіти лактобактерій, що володіють антифунгальними властивостями.....	10
1.3. Біотехнологічний потенціал морських лактобактерій з антимікотичними властивостями.....	16
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	19
2.1. Штами мікроорганізмів та умови культивування.....	19
2.2. Скринінг ізолятів МКБ на здатність продукувати антифунгальні сполуки.....	20
2.3. Визначення тривалості антифунгальної активності.....	22
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
3.1. Антифунгальна активність ізолятів МКБ морського походження...24	
3.2. Динаміка антимікотичної активності морських лактобактерій.....29	
3.3. Біотехнологічна схема скринінгу морських МКБ на антимікотичну активність.....33	
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	37

## ВСТУП

Майже століття після того, як були описані різноманітні види лактобактерій, дослідники приділяють велику увагу ідентифікації, характеристиці та дослідженню біотехнологічного потенціалу нових видів молочнокислих бактерій (МКБ) з раніше невідомих джерел [Al-Yami et al., 2022]. Одним із них є морське середовище, яке є неортодоксальним джерелом для виділення лактобактерій.

МКБ є відомим потенційним джерелом для генерації різноманітних вторинних метаболітів, таких як бактеріоцини, органічні кислоти, пептиди та інші сполуки [Bryamova et al., 2020]. Споживання їжі, що містить велику кількість хімічних консервантів, спровокувало інтерес та попит споживачів до використання натуральних і мінімально оброблених продуктів, з акцентом на використання природних антимікробних та антифунгальних агентів – біоконсервантів, таких як, наприклад, органічні кислоти лактобактерій [Françoise, 2010]. Біологічні консерванти стали новим фаворитом на міжнародному ринку харчових добавок не тільки завдяки їх натуральному походженню, але й за їх високу ефективність, нетоксичність або низьку токсичність, відсутність впливу на оригінальний смак харчових продуктів. Окрім того, що природне консервування є альтернативою хімічним сполукам, воно ще є додатковим інструментом у харчових технологіях, для уникнення, запобігання або відстрочення псування продуктів, яке викликане пліснявими грибами [Leyva Salas et al., 2018]. Використання в їжу заражених пліснявими грибами продуктів, може викликати отруєння, що спричинене виділенням алергійних спор та мікотоксинів [Nickelsen et al., 1997 ; Nielsen et al., 2000].

Впродовж останнього десятиліття проводилися дослідження, щодо антимікотичної активності лактобактерій виділених з різних джерел для консервації та збільшення терміну зберігання харчових продуктів, а саме морепродуктів, молочних продуктів, хлібобулочних виробів, фруктів та овочів [Lynch et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Saladino et al., 2016]. Пізні

дослідження показали, що багато штамів МКБ мають потенціал впливати на проліферацію грибів у різних продуктах харчування [Mauch et al., 2010]. Однак, нами було знайдено недостатню кількість інформації стосовно лактобактерій з Чорного моря та їх антифунгальних властивостей, що свідчить про їх недостатню вивченість.

У зв'язку зі всім зазначеним вище, перспективним є скринінг нових штамів МКБ з Чорного моря на здатність продукувати антифунгальні сполуки з метою їх подальшого застосування у харчовій біотехнології. Слід зазначити, що потребує також оптимізації процедура скринінгу морських лактобактерій на антимікотичні властивості.

Метою роботи є вивчення антифунгальної активності лактобактерій з Чорного моря та їх біотехнологічного потенціалу.

Для досягнення вказаної мети вирішували такі задачі:

1. Провести скринінг лактобактерій з морської води та мідій на здатність інгібувати плісняві гриби та відібрати найактивніші ізоляти.
2. Вивчити динаміку інгібувальної активності морських лактобактерій на міцелій та спороутворення пліснявих грибів та встановити характер інгібувальної дії.
3. Визначити динаміку пригнічення спороутворення пліснявих грибів лактобактеріями морського походження.
4. Розробити та відпрацювати біотехнологічну схему проведення скринінгу ізолятів МКБ морського походження на здатність продукувати антифунгальні сполуки та встановити її ефективність.

Об'єкт дослідження – антифунгальна активність морських лактобактерій та їх біотехнологічний потенціал.

Предмет дослідження – інгібувальна дія лактобактерій з води та мідій Чорного моря на плісняві гриби, а також перспективи їх використання у різних галузях біотехнології.

Щиро вдячна співробітникам Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного (м. Київ) за надані штами грибів.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Характеристика молочнокислих бактерій з морських джерел

МКБ є групою мікроорганізмів, що, відповідно до сучасної системи класифікації бактерій, відносяться до порядку *Lactobacillales*, класу *Bacilli*, типу *Firmicutes*. До лактобактерій відносяться мікроорганізми наступних родів: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* та *Weissella* [Walter, 2008; Khalid, 2011].

За своєю морфологією лактобактерії можуть бути як паличками так і коками, які часто зустрічаються в ланцюжках [Kathiresan et al., 2008]. МКБ проявляють позитивну реакцію при забарвленні за Грамом. Селективні культуральні середовища та фенотипові тести дозволяють диференціювати лактобактерії від морфологічно подібних бактерій [Konings et al., 2000].

МКБ проявляють негативну реакцію при проведенні тесту на каталазу та високу стійкість до низьких показників рН. Лактобактерії, як правило, не здатні до руху. МКБ є вимогливими до складу поживного середовища, що іноді створює проблеми при їх культивуванні [Van Geel-Schuttená et al., 1998; De Vuyst et al., 2007; Kaban et al., 2008; König et al., 2009]. Для ДНК лактобактерій є характерним низький вміст G-C пар [König et al., 2009].

Єдиним способом отримання енергії є бродіння вуглеводів, які вони використовують як джерело енергії та, в той же самий час, як кінцеві акцептори електронів, виділяючи молочну кислоту в якості головного продукту метаболізму. Таке бродіння носить назву «молочнокисле» [Alakomi et al., 2000; De Vuyst et al., 2007; König et al., 2009]. Не зважаючи на це вони є аеротолерантними мікроорганізмами [König et al., 2009]. На основі здатності утворювати різні продукти при зброджуванні цукрів серед лактобактерій виділяють гомоферментативні та гетероферментативні. Так для гомоферментативних представників цієї групи мікроорганізмів характерно утворення молочної кислоти як основного продукту метаболізму. На відміну

від них гетероферментативні МКБ, окрім лактату, виділяють також у середовище культивування етиловий спирт, ацетат та вуглекислий газ [McDonald et al., 1987; Zúñiga et al., 1993; Mokoena et al., 2016].

Для вирощування лактобактерій використовують складні поживні середовища, оптимальне значення рН яких складає 5,5–5,8 [Khalid, 2011].

Морські штами МКБ мають набагато кращий потенціал, ніж їхні наземні аналоги, завдяки своїм унікальним властивостям [Babu Prasada et al., 2013]. Лактобактерії виділені з морського середовища є більш витривалими. Для деяких штамів температура, яка необхідна для росту знаходиться у діапазоні від -8 до 2 °С, тоді як для МКБ виділених з наземного середовища – 37 °С. Морські штами є стійкішими до високої концентрації солей. Тобто вони є галотолерантними. Види *Carnobacterium* з Антарктичного озера є нейтрофільними, найкраще ростуть при рН 7,0. При вирощуванні в бульйоні з рН 8,5, кінцевий рН знижується до 4,7-5,2. Таке низьке значення рН може виключити ріст інших бактерій, присутніх у лужному середовищі, пов'язаному з морською водою [Spielmeyer et al., 1993].

Що стосується тварин-мешканців морського середовища, то велика кількість різноманітних видів лактобактерій виділялись з мідій, риб та губок. У дослідженнях болгарських вчених, які проводилися у 2020 році, штами МКБ з антифунгальною активністю виділяли з мідій *Mytilus galloprovincialis* Lam. з болгарської акваторії Чорного моря. Бактерії культивували на MRS-середовищі при 37 °С і в умовах обмеження доступу кисню. Два штами лактобактерій утворювали світло-блакитні колонії на модифікованому середовищі MRS з додаванням 1 мМ X-Gal. Світлова мікроскопія МКБ, виділених на MRS-агарі, показала, що клітини мають подовжену форму та забарвлюються позитивно за Грамом. Клітини показали негативний результат при проведенні тесту на каталазу. Це дало змогу припустити, що ці лактобактерії є представниками роду *Lactobacillus*, а саме *Lactobacillus plantarum* [Ibryamova et al., 2020].

Іншими вченими було досліджено кишківник морських риб, таких як *Zeus faber*, *Diplodus sargus*, *Diplodus cervinus*, *Scorpaena scrofa*, *Labrus mixtus* та *Balistes caprisus* і встановлено, що лактобактерії видів *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus* sp. населяють кишківники цих видів риб. У той же самий час МКБ були відсутніми у кишківниках риб *Conger conger*, *Mugil cephalus*, *Scyliorhinus canicula*, *Sarpa salpa*, *Labrus bergylta*, *Carcharhinus obscurus* [Alonso et al., 2019].

У роботі вітчизняних вчених була досліджена мікробіота губок. Ними було повідомлено про виділення 63 штамів МКБ роду *Lactobacillus* з чорноморських губок роду *Haliclona*, відібраних в одеській затоці. Дослідниками було встановлено, що виділені штами належать до видів *Lactobacillus vaccinofermentans*, *L. bifermentans* та *L. parabuchneri* на основі визначення спектрів жирних кислот, які входять до складу клітин МКБ, за допомогою газової хроматографії. У найбільшій кількості жирні кислоти клітин даних мікроорганізмів були представлені ізомерами гексадеканової, нонадеканової та 9-октадецененової жирних кислот. Крім того, було показано, що співвідношення видів залежало від виду губки-господаря та найбільш поширеними виявилися бактерії виду *L. parabuchneri*, складаючи 55,6% серед усіх виділених. Бактерії видів *L. bifermentans* та *L. vaccinofermentans* зустрічалися рідше (36,5% та 7,9%, відповідно) [Страшнова та ін., 2020]. Що стосується їх культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей, то бактерії даних штамів проявляли здатність до інтенсивного росту в поживному середовищі, що містить 2,5–5,0% NaCl, ферментували молоко з рівнем утворення органічних кислот 30–90 °Т після 48 годин інкубації за оптимальної температури [Страшнова та ін., 2020].

У публікаціях іноземних вчених також було описано штами лактобактерій з губок, однак губки для досліджень відбиралися з Японського моря. З губок даного моря було виділено навіть новий вид лактобактерій – *Marinilactibacillus psychrotolerans* [Ishikawa et al., 2003].

Повідомлено також, що з кишківника гігантської тигрової креветки (*Penaeus monodon*) було виділено бактерії виду *Lactobacillus acidophilus*. Колонії цих бактерій були кремового, бежевого кольору та за своєю формою були округлими з гладкою поверхнею. Клітини мали вигляд маленьких паличок, що проявляли позитивну реакцію при забарвленні за Грамом. У рідкому бульйоні MRS вони утворювали рівномірну каламутність. Бактерії даного штаму були гомоферментативними і проявляли позитивну реакцію на зброджування галактози, глюкози, фруктози, маніту, лактози, сахарози та мальтози, але не рамнози. Дані мікроорганізми не мали каталази, що є типово для більшості лактобактерій та, окрім того, у них було відмічено відсутність ферменту амілази. Досліджені бактерії проявляли стійкість до солей жовчних кислот та продукували  $H_2S$  [Karthikeyan et al., 2009].

Отже, лактобактерії є досить добре охарактеризованою групою біотехнологічно важливих мікроорганізмів. Вони є досить поширеними, в тому числі й серед морських мешканців. Однак, що стосується МКБ саме з Чорного моря, то дані мікроорганізми є вивченими недостатньо, на що вказують лише поодинокі повідомлення у науковій літературі. На нашу думку, перспективним є виділення нових штамів лактобактерій з різних екологічних ніш Чорного моря та вивчення їх біотехнологічного потенціалу.

## **1.2. Метаболіти лактобактерій, що володіють антифунгальними властивостями**

Для МКБ є характерна здатність продукувати антимікотичні сполуки, що є надзвичайно цінним для біотехнології та біомедицини. У літературі існує обмежена кількість інформації щодо даного напрямку досліджень, однак вченими було повідомлено про декілька сполук, відповідальних за протигрибкову активність лактобактерій, серед них: органічні кислоти (молочна, оцтова, фенілмолочна, піролідон-5-карбоксільна кислота), пероксид водню, реутерин, білкові сполуки, дикетопіперазини або циклічні

дипептиди, гідроксипохідні жирних кислот, бензойна кислота, леткі сполуки, нуклеозиди, екзополісахариди [Abouloifa et al., 2022].

Запропоновані механізми, що пояснюють інгібувальну дію МКБ на гриби, полягають у конкуренції за доступні поживні речовини та простір, [Oliveira et al., 2014]. Іншими вченими було виявлено, що механізм протигрибкової дії супернатанту *L. plantarum* K35 полягає у спричиненні пошкодження цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки з подальшим витоком цитоплазматичного вмісту, утворенням мембранних везикул з наступним руйнуванням мітохондрій та ядер [Sangmanee et al., 2014].

Вважається, що продукування органічних кислот лактобактеріями, визначає їх здатність до інгібування мікотоксигенних грибів. Відомо також, що тип і кількість кислот відрізняються від штаму до штаму [Guimarães et al., 2018a]. Ці сполуки утворюються у процесі зброджування цукрів, що призводить до швидкого закислення довкілля і запобігання розвитку патогенів [Leroy et al., 2006].

Russo та ін. [2017] перевірили активність деяких штамів МКБ проти грибів роду *Aspergillus*, *Fusarium* і *Penicillium* і повідомили, що молочна кислота продукувалася ними у високій концентрації як основний протигрибковий засіб, пов'язаний з низьким рН. Молочна кислота також була визначена як основна протигрибкова сполука видів лактобактерій *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* і *L. plantarum* [Nasrollahzadeh et al., 2020].

Для молочної та оцтової кислот відома синергідна протигрибкова активність [Nasrollahzadeh et al., 2022]. Однак завдяки вищому рКа, що викликає вищий рівень дисоціації всередині клітини, оцтова кислота має сильнішу антимікотичну активність [Crowley et al., 2013; Dagnas et al., 2015].

З суміші кислот, що продукуються лактобактеріями, молочна кислота в основному знижує внутрішньоклітинний рН і пригнічує різні метаболічні функції, тоді як оцтова кислота, крім того, перешкоджає підтримці

потенціалу клітинної мембрани, пригнічує активний транспорт і пошкоджує клітинну мембрану патогенів [Ross et al., 2002; Aitzhanova et al., 2021].

Серед сполук-антимікотиків відомий також 3-феніллактат або фенілмолочна кислота. Дана речовина є одним з метаболітів обміну фенілаланіну і може утворюватися в клітинах МКБ з п-гідроксифеніл пірувату. Цей кінцевий метаболіт проявляє антибіотичну активність щодо широкого кола мікроскопічних грибів та, крім того, Грам позитивних і Грам негативних бактерій [Lavermicossa et al., 2000]. Згідно з літературними даними, *L. plantarum* має здатність утворювати кілька подібних речовин: феніллактат, 4-гідрокси-феніллактат, а також 3-гідрокси-феніллактат, у той час як *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus sakei* та *Pediococcus pentosaceus* утворюють тільки феніллактат [Ström et al., 2002]. У дослідженні Guimarães та інших [2018b] було виявлено, що бактерії штаму *L. plantarum* UM55 продукують молочну кислоту, фенілмолочну кислоту та індолмолочну кислоту. Кислоти були індивідуально протестовані проти *Aspergillus flavus*, і серед них фенілмолочна кислота продемонструвала найсильніші пригнічувальні ефекти з отриманою IC<sub>90</sub> 11,9 мг/мл.

Серед органічних кислот відома також піролідон-5-карбоксильна кислота. Вона утворюється лише деякими видами МКБ, такими, як *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum*, і володіє бактерицидною активністю щодо *Bacillus subtilis* і *Enterobacter cloacae* [Yang et al., 1997].

МКБ також здатні продукувати й пероксид водню. Антимікробна та антимікотична дія пероксиду пов'язана з сильним окисним ефектом. Так як МКБ не продукують каталазу, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не може розкладатися і, відповідно, накопичується у клітинах, та при виділенні запобігає росту грибів [Nes et al., 1996]. Накопиченням бактеріями родів *Lactococcus* і *Lactobacillus* перекисів пояснюють також інгібування росту золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*) і Грам негативних *Pseudomonas* spp., які призводять до псування харчових продуктів [Yang et al., 1997]. Bundgaard-Nielsen та Nielsen [1996]

виявили, що 3% розчин  $H_2O_2$  виявляє низьку протигрибкову активність використовуючи в якості індикаторних мікроорганізмів *Penicillium*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus* і *Eurotium*, але пошкоджує конідії семи видів пліснявих грибів. Martin та Maris [2012] перевірили протигрибкову дію  $H_2O_2$  і 17 видів кислот на плісняві гриби. Результати показали, що мурашина, оцтова, пропіонова, шавлева та молочна кислоти проявляють синергічний ефект з  $H_2O_2$ , що призводить до більш сильної антифунгальної активності.

Деякі реакції утворення  $H_2O_2$  поглинають кисень, створюючи таким чином анаеробне середовище, яке не підходить для розвитку певних організмів. Відомо, що збагачення  $CO_2$  у відносно низьких концентраціях посилює токсичну дію  $H_2O_2$  на умовно-патогенні мікроорганізми [Martirosyan et al., 2012].

Серед антимікотичних сполук, що продукують бактерії групи МКБ, відомий також реутерин ( $\beta$ -ОН-пропіоновий альдегід). Ця речовина утворюється в анаеробних умовах з гліцерину бактеріями видів *Lactobacillus reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* і *L. coryniformis* [Sjögren et al., 2003]. Вченими показано, що проростання спор *Fusarium culmorum*, *Aspergillus niger* і *Penicillium expansum* пригнічувалося реутерином, що продукується *Limosilactobacillus reuteri* R29. Встановлено, що мінімальна інгібувальна концентрація (МІК) 90 реутерину проти *F. culmorum* становила 4 ммоль/л, тоді як його МІК 90 проти *A. niger* і *P. expansum* становила 8 ммоль/л [Schmidt et al., 2018].

Активність МКБ проти грибів здебільшого обмежена фунгістатичною, а не фунгіцидною дією. Реутерин, однак, окрім фунгістатичної, має також і фунгіцидну дію. Очищений реутерин, отриманий з *L. reuteri* ATCC 53608, володіє фунгіцидною активністю, знищуючи 99,9% індикаторних мікроорганізмів у концентраціях, що дорівнюють або нижчі 15,6 мМ. Як антифунгальний засіб його потім додавали в йогурт. У йогурті реутерин

також проявляв фунгістатичну дію при концентрації 1,38 мМ і фунгіцидну дію при концентрації 6,9 мМ [Vimont et al., 2019].

Також безклітинний супернатант з найвищою концентрацією реутерину, продуцентами якого є бактерії штаму *L. reuteri* R29, повністю запобігав проростанню спор таких видів грибів, як *F. culmorum*, *A. niger* і *P. expansum* [Schmidt et al., 2018]. Реутерин, що продукується *L. reuteri*, повністю пригнічує ріст *P. expansum* у концентрації 10 ммоль/л, і концентрація реутерину позитивно корелює з антимікотичними ефектами в певному діапазоні [Ortiz-Rivera et al., 2017].

Противіробкові пептиди МКБ проявляють також потенційні противіробкові властивості щодо мікотоксикогенних грибів родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* і *Rhizopus*. Дані сполуки також пригнічують синтез мікотоксинів і спричиняють детоксикацію мікотоксинів у рослинній сировині, з якої виробляється корм для риби, що важливо для аквакультури [Khalil et al., 2013; Muhialdin et al., 2020].

Синтез дикетопіперазинів відбувається нерибосомальним шляхом і в цьому процесі бере участь мультифункціональний фермент. Дикетопіперазини можуть також утворюватися з пептидів в умовах лужного або кислого середовища. Дикетопіперазини, які утворюються деякими штамми МКБ наведені у таблиці 1 [Magnusson et al., 2003].

Таблиця 1

**Дикетопіперазини, що синтезуються МКБ [Magnusson et al., 2003]**

<b>Дикетопіперазини</b>	<b>Продуцент</b>
Цикло (L-Фен-L-Про)	<i>L. plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3
Цикло (L-Фен-транс-4-ОН-L-Про)	<i>L. plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3
Цикло (L-Фен-цис-4-ОН-D-Про)	<i>P. pentosaceus</i> MiLAB 170, <i>L. plantarum</i> MiLAB 14

Крім того, МКБ утворюють гідроксипохідні жирних кислот з їх ненасичених аналогів. Ненасичені жирні кислоти проявляють антибіотичну активність щодо широкого кола дріжджів і пліснявих грибів [Sjögren et al., 2003]. Sjögren та ін. [2003] охарактеризували 3-гідроксидодеканову кислоту, 3-гідроксиддеканову кислоту, 3-3-гідрокси-5-цис-додеценіву кислоту та гідрокситетрадеканову кислоту з супернатанту *L. plantarum* MiLAB 14. Гідроксипохідні жирних кислот демонстрували інгібування в діапазоні 10 до >100 мкг/мл і, як повідомляється, вони набагато ефективніші, ніж циклічні дипептиди, проти деяких пліснявих грибів та дріжджів [Sjögren et al., 2003].

Також МКБ є продуцентами летких сполук, таких як діацетил та ацетоїн. Leuva Salas та ін. [2019] виділили 35 летких сполук з молочних продуктів, ферментованих МКБ з антифунгальними властивостями, серед яких діацетил і ацетон демонстрували значну інгібувальну дію проти *Penicillium common* і *Mucor ramosus*. Aunsbjerg та ін. [2015] виділили діацетил, основну летку сполуку, з *Lactobacillus paracasei* DGCC2132, який уповільнював ріст *Penicillium* на 5 днів у концентраціях вище 75 мкг/мл. Крім того, Coda та ін. [2011] виявили, що розчинний екстракт *Lactiplantibacillus plantarum* у буфері Tris-HCl містив етилацетат і етанол, і підтвердили, що проростання конідій *Penicillium roqueforti* повністю інгібується, коли концентрації етилацетату та етанолу становлять 6,81 і 1,69 мг/мл відповідно.

Нуклеозиди є одними із основних елементів клітин, які підтримують життя, беруть участь у метаболічних процесах ДНК і, окрім того, виконують різноманітні протипухлинні, противірусні та антимікотичні функції [Dan et al., 2021]. Ryan та ін. [2011] виділили та ідентифікували два нуклеозиди з антифунгальною активністю, а саме цитидин та 2'-дезоксцитидин, із безклітинного супернатанту *L. amylovorus* LA 19280, і повідомили, що ці нуклеозиди показали антимікотичну активність проти *Aspergillus fumigatus* із значеннями МІК >200 мг /мл. Chen та ін. [2021] також виявили цитидин і 2'-дезоксцитидин у безклітинному супернатанті *Lactobacillus kefir* M4 і

*Pediococcus acidilactici* MRS-7, які сповільнювали ріст *P. expansum*. Крім того, нуклеозиди також були виявлені в безклітинному супернатанті інших видів МКБ, таких як *L. plantarum*, *Propionibacterium freudenreichii*, *L. reuteri* та *L. brevis* [Le Lay et al., 2016; Yépez et al., 2017]. Проте дослідження цитидину, що продукується МКБ, обмежені, а механізми антифунгальної дії цитидину все ще неясні.

Екзополісахариди, як вторинні метаболіти лактобактерій, також показали свою антимікотичну активність. Rodrigues та ін. [2005] повідомили, що кефіран – істивний, біодеградабельний і водорозчинний екзополісахарид, який продукується МКБ і може запобігти росту бактерій і пліснявих грибів, з МІК 462 мг/л проти *C. albicans*. Nehal та ін. [2019] виявили, що екзополісахарид, що продукується *L. lactis* F-MOU, також демонструє значну протигрибкову дію проти *C. albicans* з МІК 16 мг/мл.

Отже, в науковій літературі наявна достатня кількість інформації щодо дії метаболітів МКБ на плісняві гриби, які є шкідливими для харчової промисловості, але інформації про використання метаболітів саме морських лактобактерій замало.

### **1.3. Біотехнологічний потенціал морських лактобактерій з антимікотичними властивостями**

Хлібобулочні вироби є одними з найпопулярніших продуктів, які щодня споживаються людьми у всьому світі [ReportLinker, 2020]. Вони є поживними, але мають схильність до зараження пліснявими грибами, що призводить до скорочення терміну зберігання, зниження якості та безпеки, через продукцію ними небезпечних афлотоксинів та мікотоксинів [Liu et al., 2022]. Таким чином, пригнічення росту та розвитку пліснявих грибів на хлібобулочних виробах має економічне та медичне значення.

Для продовження терміну придатності хлібобулочних виробів часто використовують хімічні консерванти, але їх тривале споживання може збільшити ризик виникнення хронічних захворювань [Qian et al., 2021].

Останнім часом споживачі все більше вимагають продуктів харчування з меншою кількістю хімічних консервантів. Лактобактерії привернули увагу як потенційний варіант біологічного консерванту, оскільки вони загальноновизнані безпечними і продукують метаболіти, які можуть інгібувати розвиток пліснявих грибів. У результаті проведених досліджень було доведено, що застосування лактобактерій як біологічних консервантів не тільки продовжує термін придатності хлібобулочних виробів, але й покращує хлібопекарські властивості, включаючи текстуру й смак [Liu et al., 2022].

Sun та ін. [2020] при проведенні досліджень додали в тісто суспензію *L. plantarum* LB-1, яка мала виражену антифунгальну дію проти *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* і *Penicillium citrinum*, і подвоїли завдяки цьому термін придатності цільнозернового хліба, від 3 до 6 днів.

Цікаво, що лактобактерії демонструють різну антимікотичну активність у заквасках, виготовлених із різних злаків. Axel та ін. [2016] підтвердили вищезазначені погляди, і вони повідомили, що *L. reuteri* R29 і *L. brevis* R2 δ з антимікотичною активністю були введені в кіноа та біле рисове борошно для приготування хліба. Однак, термін придатності хліба з кіноа та хліба з білого рисового борошна, інокульованих тими самими МКБ, був різним. Концентрація карбонової кислоти в заквасці кіноа була значно вищою, ніж у рисовій заквасці, що вказувало на те, що рівень метаболітів, що продукуються лактобактеріями, у заквасках, виготовлених із різних зернових культур, різний.

В інших дослідженнях *Lactobacillus paracasei* CIRM-BIA1759 та *L. rhamnosus* CIRM-BIA1761 були протестовані як додаткові культури у сметані та напівтвердих сирах. Дослідження *in situ* показали, що штами затримують ріст *P. commune*, *Rhodotorula mucilaginosa* та *Mucor racemosus* на сметані на 2–24 дні, а також затримують ріст *P. commune* у напівтвердому сирі на 1–6 днів [Salas et al., 2018].

Також відомо, що за допомогою антифунгальних властивостей МКБ можна довше зберігати фрукти та овочі. Lan та ін. [2012] розпорощували певну концентрацію ферментаційного бульйону лактобактерій на поверхні винограду, що містив *Penicillium oxalate*. Дані маніпуляції подовжували термін його зберігання на 6 днів.

Однак, незважаючи на наявність оглядів про застосування антимікотичних МКБ у харчовій біотехнології, нами не було знайдено жодних повідомлень про біотехнологічний потенціал подібних штамів лактобактерій з Чорного моря. Дослідження, спрямовані на визначення антимікотичних властивостей штамів МКБ із водних організмів та морської води, можуть сприяти розробці альтернативних методів біоконсервації харчових продуктів.

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконувалась в біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І. І. Мечникова впродовж 2022-2023 навчальних років.

### 2.1. Штами мікроорганізмів та умови культивування

У роботі було використано вісім ізолятів МКБ з морської води (В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, В.2.3, В.2.4 ) та п'ять ізолятів з мідій (М4.1, М5.1, М5.2, М7.1, М7.2). Досліджувані ізоляти були виділені з морської води та чорноморських мідій (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck), проби яких були відібрані на біостанції ОНУ імені І. І. Мечникова. Для культивування МКБ використовували класичне агаризоване MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) наступного складу: дріжджовий екстракт – 5 г/л; м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) – 10 г/л; пептон – 10 г/л; Tween-80 – 1 мл/л; глюкоза – 20 г/л;  $K_2HPO_4$  – 2 г/л;  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,58 г/л;  $MnSO_4 \times 4 H_2O$  – 0,25 г/л; ацетат натрію – 5 г/л; агар-агар – 15 г/л; дистильована вода – 1 л [de Man et al., 1960]. Для приготування даного середовища розчиняли усі компоненти в 1 л дистильованої води. Обережно нагрівали з помішуванням, щоб повністю розчинити середовище та стерилізували автоклавуванням при температурі 121 °С та тиску 1 атм. протягом 15 хвилин.

МКБ зберігали при +4 °С шляхом періодичного культивування. Для цього чашки Петрі з MRS агаром засівали лактобактеріями методом штриха в асептичних умовах та культивували при 37 °С впродовж двох діб. Після інкубації чашки обстежувалися на однорідність росту з метою встановлення чистоти культури та поміщалися в холодильник при +4 °С. Пересіви здійснювали кожного місяця.

Для дослідження було використано два штами грибів: *A. niger* УКМ F-16706 та *P. expansum* УКМ F-575 з колекції Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного (м. Київ). Для культивування грибів використовувався картопляний агар (англ. PDA).

Картопляний агар готували на основі картопляного настою та декстрози, які сприяють активному росту грибів, у кількості 200 г та 20 г відповідно [Aryal, 2022]. Як желуючий агент (затверджувач) додавали 20 г агару. І останнім компонентом була дистильована вода – 1 л. Для приготування картопляного настою, 200 г добре вимитої, неочищеної, нарізаної картоплі відварювали в 1 л дистильованої води протягом 30 хв. Отриману суміш відфільтрували через марлю, зберігаючи стоки, якими і є картопляний настій. Картопляний настій змішували з декстрозою, агаром та дистильованою водою і кип'ятили при постійному перемішуванні до розчинення. Стерилізацію проводили автоклавуванням протягом 15 хв. при температурі 121°C та тиску 1 атм [Aryal, 2022].

Гриби, зі скошеного середовища на якому вони зберігалися, розсівали у підготовлені чашки Петрі з поживним середовищем методом штриха на три сектори. Вирощували при + 25 °C впродовж трьох днів. Після інкубації перевіряли чистоту культур візуально за характером та однорідністю росту.

## **2.2. Скринінг ізолятів МКБ на здатність продукувати антифунгальні сполуки**

Для визначення антифунгальної активності морських МКБ використовували метод дифузії в агар згідно з [Matevosyan et al., 2019] з деякими модифікаціями.

Штами МКБ, які зберігалися на MRS агарі при +4 °C, пересівали в MRS бульйон, який відрізняється від наведеного вище складу MRS агару лише відсутністю агар-агару. Інкубацію проводили при 37 °C впродовж 24 годин. Визначали концентрацію клітин добових культур лактобактерій на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad, США) при довжині хвилі 600 нм.

Для приготування посівного матеріалу пліснявих грибів, яким слугувала суспензія спор, брали трьохдобові культури грибів, вирощені на картопляному агарі. Суспензію готували у стерильному фізіологічному

розчині в який вносили декілька петель спор, знятих з поверхні міцелію грибів.

Після отримання суспензії рахували кількість спор в 1 мл. Підрахунок здійснювали в камері Горяєва при загальному збільшенні мікроскопу 80X. Лабораторна камера Горяєва є спеціальним монолітним предметним склом, призначеним для підрахунку кількості спор у заданому об'ємі рідини. Камера Горяєва, що використовувалася у даній роботі, є чотирисітковою (чотирьохкамерною). Вона складається із прозорого монолітного товстого предметного скла з поперечними прорізами і спеціально нанесеною мікроскопічною сіткою [Денисенко, 2019].

У чотирисітчастій камері Горяєва предметне скло має п'ять прорізів, що утворюють чотири поперечно розташовані майданчики, при цьому два внутрішніх додатково розділені поздовжнім прорізом для отримання чотирьох однакових камер, на кожному з яких нанесена (викарбувана) мікроскопічна сітка площею 9 мм<sup>2</sup>. Два бічні майданчики розташовані на 0,1 мм вище двох внутрішніх, і таким чином служать для притирання покривного скла [Денисенко, 2019].

Притирали покривне скло до бічних майданчиків камери Горяєва до появи на місці контакту кольорових кілець Ньютона з обох країв (тільки за цих умов розрахункове значення об'єму камери відповідало об'єму суспензії) [Бородай, 2022]. У сформовану камеру через капілярні простори вносили суспензією спор грибів [Філімоненко, 2019].

Підраховували кількість спор у 15 великих квадратах сітки, переміщаючи їх по діагоналі. Підрахунки проводили у двох повторах для достовірності і вираховували середнє арифметичне. Також для виключення помилок підрахунку спор грибів, пов'язаних з їх знаходженням на межах квадратів, застосовували правило Єгорова: рахували спори, що знаходяться усередині квадрата, а також ті, що торкалися лівої та верхньої меж. Спори що торкалися правої та нижньої меж не враховувалися. Так як, кількість спор в

сітці відома та об'єм камери Горяєва дорівнює 0,9 мкл, кількість спор грибів (X) в 1 мл суспензії ми обчислювали за формулою:

$$X = \frac{n \cdot 10^3}{0.9}$$

де n – кількість спор в сітці камери Горяєва, а  $10^3$  – коефіцієнт переводу мл в мкл [Філімоненко, 2019].

Обов'язковим етапом була стандартизація отриманих концентрацій спор різних видів грибів у суспензіях та за кінцеву концентрацію було прийнято значення  $10^4$  спор/мл [Matevosyan et al., 2019]. Для цього здійснювали розведення суспензій спор до вказаної кінцевої концентрації з використанням фізіологічного розчину.

Антимікотичні властивості МКБ визначали в 24 лункових планшетах, які стерилізували промиванням 70% етиловим спиртом та ультрафіолетом упродовж 3 годин. У лунки стерильного планшету наливали 1 мл попередньо розплавленого 1,5% MRS агару. Після застигання середовища у кожен лунку вносили 100 мкл добових культур лактобактерій з відомою концентрацією клітин. В якості контролю використовували бульйон MRS. Інкубацію здійснювали впродовж 48 годин при 37 °C [Matevosyan et al., 2019].

Після цього, у кожен лунку додавали 50 мкл суспензії спор грибів у концентрації  $10^4$  спор/мл та інкубували при 25 °C протягом двох днів [Matevosyan et al., 2019]. На другий день лунки планшету обстежували на наявність росту міцелію грибів та спороутворення. Візуально оцінювати відсоток площі лунки покритої міцелієм та/або спорами та, відповідно, визначали відсоток інгібування росту міцелію та пригнічення спороутворення, спричинений лактобактеріями.

### **2.3. Визначення тривалості антифунгальної активності**

Планшети з МКБ та спорами грибів поміщали в термостат та інкубували при 25 °C ще впродовж п'яти днів. Кожного дня відмічали наявність та інтенсивність росту міцелію грибів, а також спороутворення та,

відповідно, встановлювали вираженість антимікотичної активності лактобактерій.

Всі експерименти було виконано двічі. Статистичну обробку даних та побудову графіків здійснювали в програмі Microsoft Office Excel.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Антифунгальна активність ізолятів МКБ морського походження

На початку досліду вимірювали концентрації бактеріальних добових культур МКБ за допомогою спектрофотометра з довжиною хвилі 600 нм. Результати дослідження наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

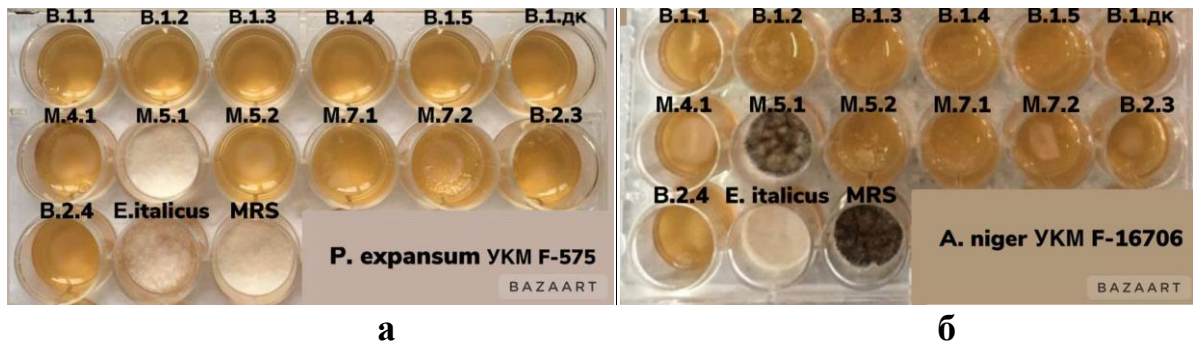
#### Кількість клітин в добових культурах МКБ морського походження

Ізолят МКБ	Концентрація клітин, кл/мл
В.1.1	$1,18 \times 10^9$
В.1.2	$1,37 \times 10^9$
В.1.3	$1,55 \times 10^9$
В.1.4	$1,16 \times 10^9$
В.1.5	$1,52 \times 10^9$
В.1.дк	$1,20 \times 10^9$
М4.1	$1,44 \times 10^9$
М5.1	$5,61 \times 10^8$
М5.2	$1,69 \times 10^9$
М7.1	$1,57 \times 10^9$
М7.2	$1,95 \times 10^9$
В.2.3	$1,61 \times 10^9$
В.2.4	$2,18 \times 10^9$
MRS бульйон	0

З отриманих даних видно, що концентрація клітин усіх добових культур, окрім МКБ М5.1, була на приблизно однаковому рівні. Концентрація клітин культури ізоляту МКБ М5.1 була на порядок нижчою та складала  $5,61 \times 10^8$  кл/мл.

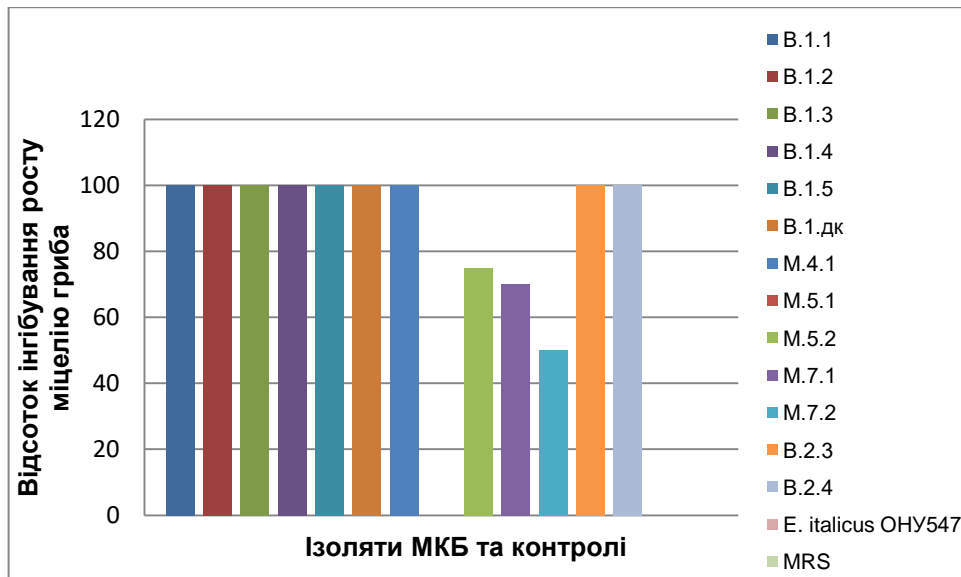
Дослідження антифунгальної активності вищевказаних культур проводили методом дифузії в агар [Matevosyan et al., 2019] та облік результатів здійснювали на другий день інкубації грибів при 25 °С. У результаті проведених експериментів встановлено, що більшість

досліджених ізолятів МКБ з морських джерел проявили високу інгібувальну активність як проти *P. expansum* УКМ F-575 так і проти *A. niger* УКМ F-16706 (Рис. 1).



**Рис. 1. Інгібувальна активність ізолятів морських лактобактерій проти штамів пліснявих грибів *P. expansum* УКМ F-575 (а) та *A. niger* УКМ F-16706 (б) (фото автора)**

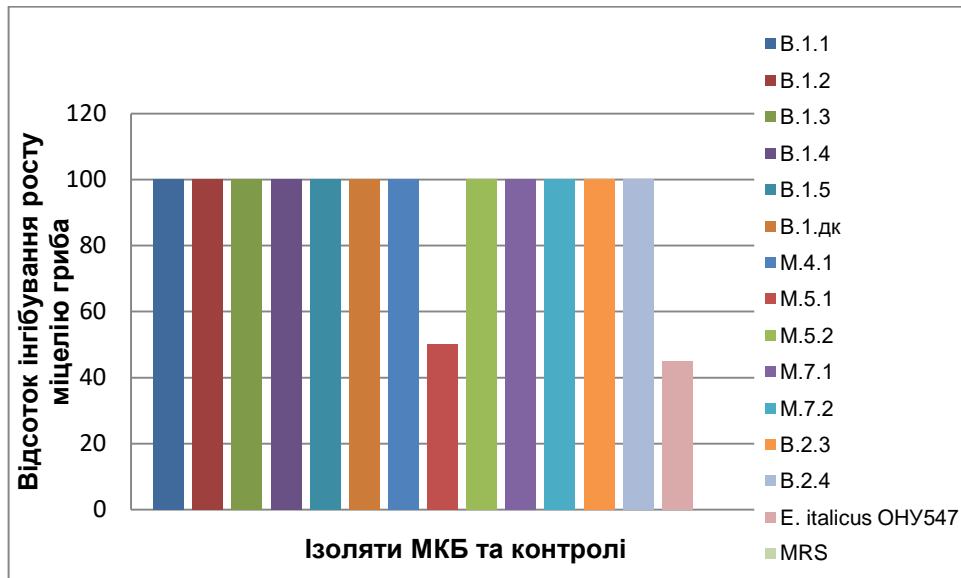
Так, бактерії ізолятів МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.д.к., В.2.3, В.2.4, які були виділені з води Чорного моря та М.4.1, виділеного з морських мідій, повністю інгібували ріст міцелію гриба *P. expansum* УКМ F-575 на другий день дослідження (Рис. 2). Інші ізоляти М.5.2, М.7.1 та М.7.2 пригнічували ріст гриба на 75, 70 та 50% відповідно. Штам МКБ М.5.1 на другий день культивування втратив здатність пригнічувати ріст міцелію даного гриба. Ці дані узгоджуються з дослідженням Chen та ін. [2021], у якому було показано, що *Lactobacillus kefir* М4 і *Pediococcus acidilactici* MRS-7, які були виділені з кефіру, методом шарів (overlay method) інгібували ріст штамів *P. expansum* LPH9, LPH10, F-WY-12-02 які були отримані з яблук і ківі. Протигрибкова активність безклітинного культурального супернатанту МКБ проти *P. expansum* LPH10 становила 100%. Активність *L. kefir* М4 і *P. acidilactici* MRS-7 знижувалася, коли значення рН безклітинного культурального супернатанту доводилися до 4,0 – 6,0 [Chen et al., 2021]. Нами вперше показано антифунгальну дію МКБ з Чорного моря проти пліснявих грибів виду *P. expansum*.



**Рис. 2.** Інгібувальна дія МКБ з морської води та мідій на ріст міцелію *P. expansum* УКМ F-575

Пригнічення спороутворення *P. expansum* УКМ F-575 морськими лактобактеріями не враховували через відсутність видимого спороутворення у контролі на другий день.

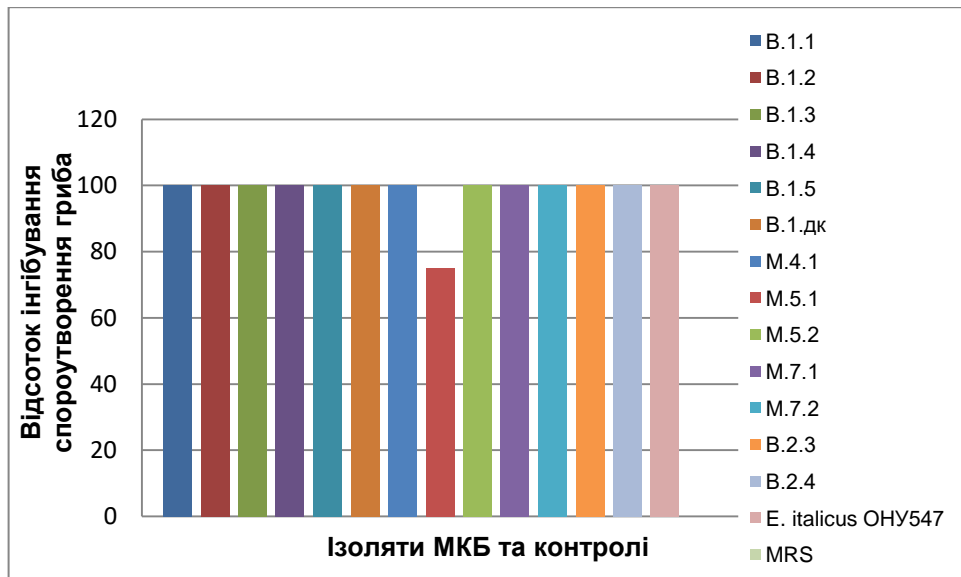
Антифунгальну активність ізолятів лактобактерій перевіряли також проти представника грибів іншого виду, а саме *A. niger* штаму УКМ F-16706. Гриби даного штаму були більш чутливими до дії морських лактобактерій, у порівнянні з *P. expansum* УКМ F-575. Протигрибкова активність бактерій ізолятів МКБ B.1.1, B.1.2, B.1.3, B.1.4, B.1.5, B.1.д.к., B.2.3, B.2.4, виділених з морської води та M.4.1, M.5.2, M.7.1, M.7.2, виділених з морських мідій, проти гриба *A. niger* УКМ F-16706 становила 100% на другий день дослідження (Рис. 3). Однак даний штам гриба виявився стійкішим до дії антимікотичних сполук ізоляту M.5.1 – відсоток інгібування росту міцелію становив лише 50%. Наші результати узгоджуються з даними болгарських вчених, які показали, що МКБ, які також були виділені з Чорного моря (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) мають різні ступені інгібування ізолятів *A. niger* [Bryamova et al., 2020]. Чутливість грибів *A. niger* до МКБ була показана також в роботі [Mateo et al., 2022].



**Рис. 3. Інгібувальна активність ізолятів МКБ морського походження проти росту міцелію *A. niger* УКМ F-16706**

Окрім інгібування росту міцелію гриба *A. niger* УКМ F-16706 досліджені штами МКБ пригнічували також і його спороутворення (Рис. 4). Усі ізоляти, окрім M.5.1 проявили 100%-ву інгібуючу дію на спороутворення. Нижчу інгібувальну активність бактерій ізоляту M.5.1 можна пояснити його гіршою здатністю до росту в бульйоні MRS. Дійсно, концентрація клітин добової культури даного ізоляту була на порядок нижчою за всі інші (Табл. 2).

Отримані нами дані збігаються з результатами дослідження іноземних вчених 2018 року, які демонструють, що антимікотична сполука реутерин, яка продукується МКБ *L. reuteri* R29, пригнічує ріст спор *A. niger* [Schmidt et al., 2018]. Тому можна зробити припущення, що антимікотичною сполукою у нашому дослідженні може бути саме реутерин. Ми плануємо підтвердити дане припущення шляхом проведення метаболомного аналізу антифунгальних сполук досліджених МКБ при виконанні наступних робіт.

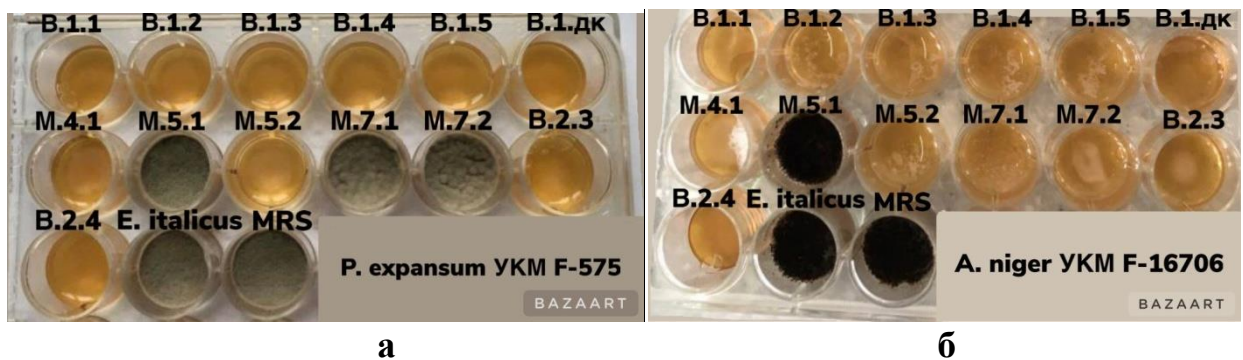


**Рис. 4. Пригнічення спорування *A. niger* УКМ F-16706 штамами лактобактерій із морської води та мідій**

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було встановлено, що ізоляти лактобактерій, виділених як з води Чорного моря так і з мідій проявляли високу антифунгальну активність і пригнічували, як ріст міцелію, так і спорування пліснявих грибів двох штамів: *P. expansum* УКМ F-575 та *A. niger* УКМ F-16706. З огляду на отримані нами результати після двох днів інкубації, можна сказати, що активними продуцентами антимікотичних сполук є усі ізоляти МКБ виділені саме з морської води, що спричинили 100% інгібування як *P. expansum* УКМ F-575 так і *A. niger* УКМ F-16706. Ізоляти МКБ, які було виділено з мідій, проявляли нижчий рівень антимікотичної активності. На нашу думку, у майбутньому необхідно збільшити кількість досліджень щодо МКБ саме з морської води, адже отримані нами результати показують, що ці мікроорганізми є більш перспективними продуцентами антимікотичних сполук, які можна застосовувати у різних галузях біотехнології. Нами планується також проведення метаболомного аналізу з метою характеристики складу антифунгальних сполук, що продукуються дослідженими ізолятами лактобактерій.

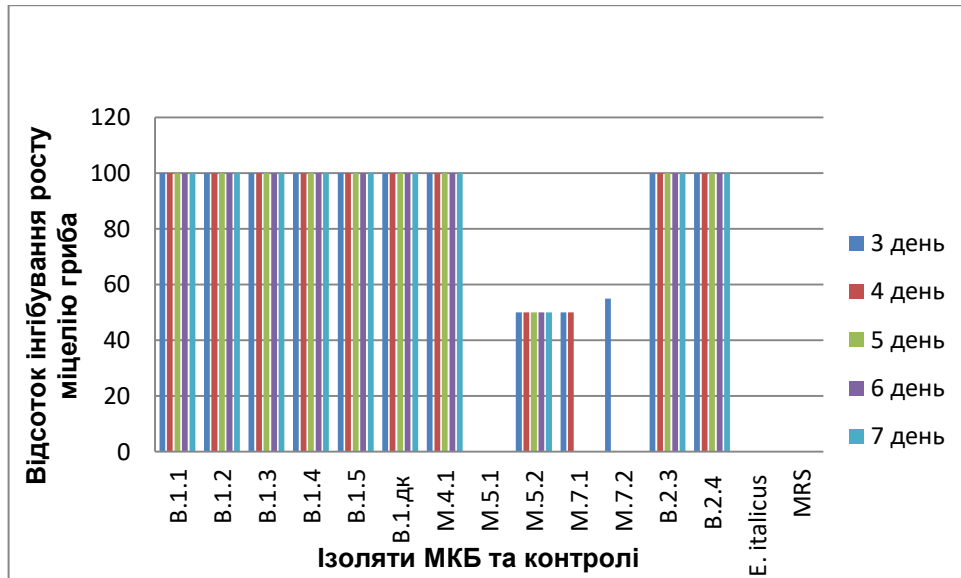
### 3.2. Динаміка антимікотичної активності морських лактобактерій

Враховували результати антимікотичної активності на 3, 4, 5, 6, 7 дні інкубації грибів при 25 °С. Встановлено, що ряд досліджених МКБ зберігали свою інгібувальну активність навіть на 7 день інкубації з оптимальними для грибів умовами (Рис. 5). Це може свідчити про фунгіцидну природу дії антимікотичних сполук, яка може бути використана у різних напрямках біотехнології.



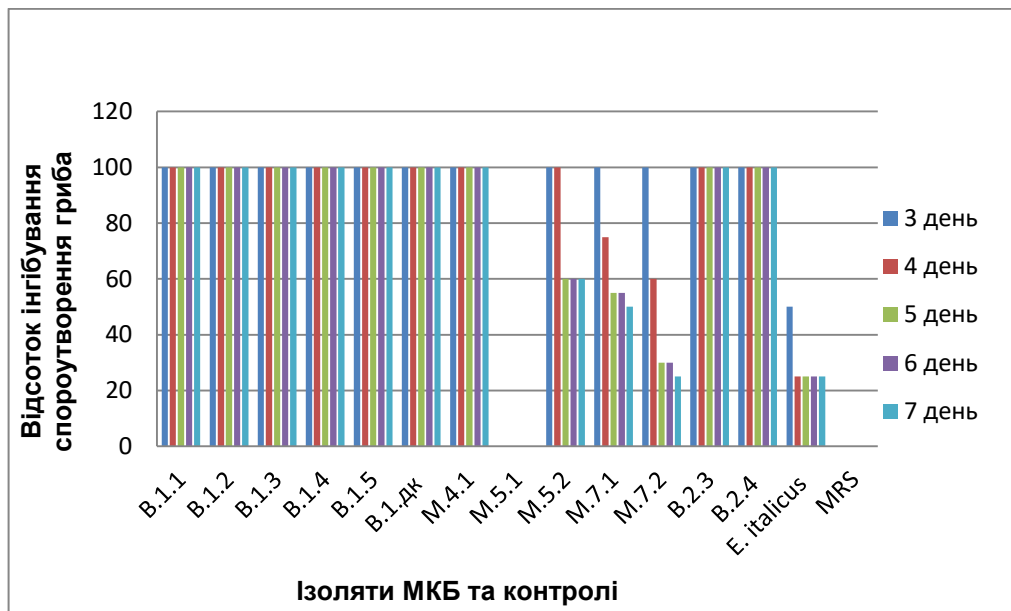
**Рис. 5.** Антифунгальна активність лактобактерій з морської води та мідій проти пліснявих грибів *P. expansum* УКМ F-575 (а) та *A. niger* УКМ F-16706 (б) на сьомий день проведення досліджень (фото автора)

Усі ізоляти МКБ, виділені з морської води та один штам лактобактерій М.4.1 з мідій проявили 100%-ву антифунгальну активність проти росту міцелію *P. expansum* УКМ F-575, яка трималася сім днів (Рис. 6). Ізоляти МКБ М.5.2, М.7.1 та М.7.2 на третій день інкубації пригнічували ріст гриба на 50, 50 та 55 % відповідно, однак інгібувальна активність штама М.5.1 у цей же період становила 0%. На сьомий день інкубації з цих трьох штамів антифунгальну активність на рівні 50% зберіг лише ізолят МКБ М.5.2.



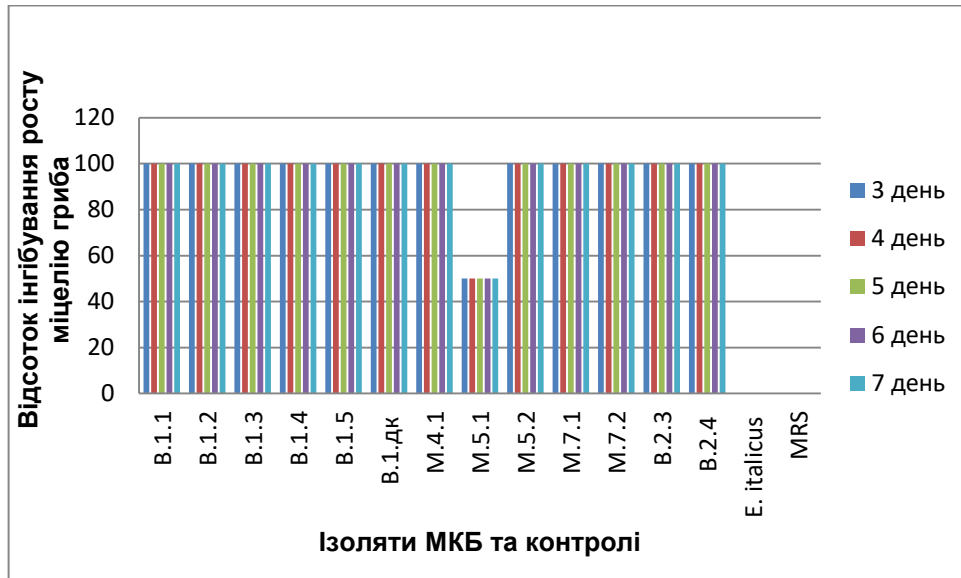
**Рис. 6. Тривалість антифунгальної активності, спричиненої ізолятами МКБ, проти росту міцелію *P. expansum* УКМ F-575**

Крім того, ізоляти B.1.1, B.1.2, B.1.3, B.1.4, B.1.5, B.1.дк, M.4.1, B.2.3 та B.2.4 повністю пригнічували спороутворення *P. expansum* УКМ F-575 упродовж семи днів (Рис. 7). Бактерії ізоляту M5.1, який було виділено з мідій, не пригнічували спороутворення даного штаму грибів.



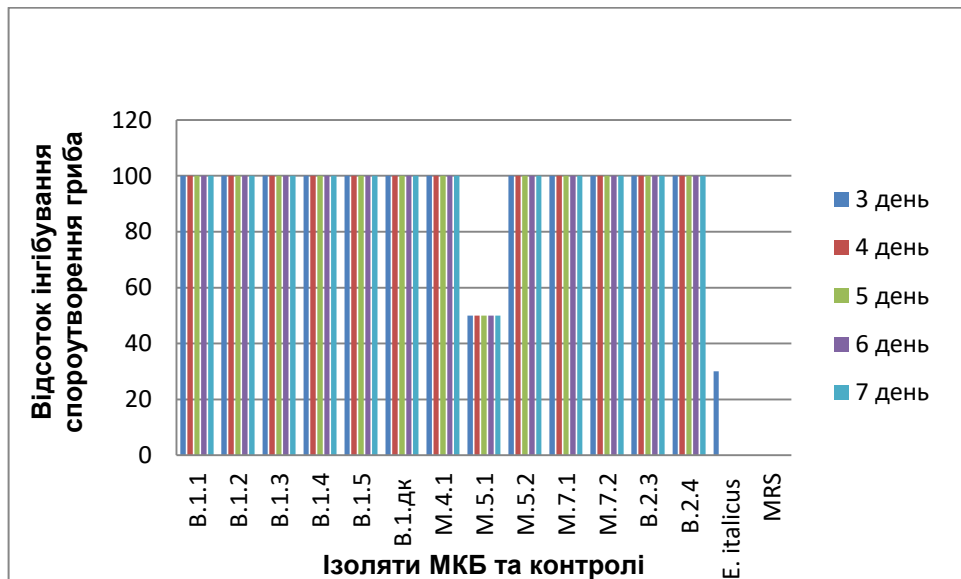
**Рис. 7. Динаміка пригнічення спороутворення *P. expansum* УКМ F-575, виклаканого морськими лактобактеріями**

У порівнянні з *P. expansum* УКМ F-575, вища інгібувальна активність морських МКБ спостерігалась по відношенню до *A. niger* УКМ F-16706, як в плані росту міцелію, так і спороутворення (Рис. 8, 9).



**Рис. 8. Тривалість інгібування росту міцелію *A. niger* УКМ F-16706, спричиненого лактобактеріями з морської води та мідій**

Так, майже всі досліджені ізоляти повністю пригнічували ріст та спороутворення гриба впродовж семи днів. Лише бактерії ізоляту МКБ M.5.1 показали свою антифунгальну активність на 50%.



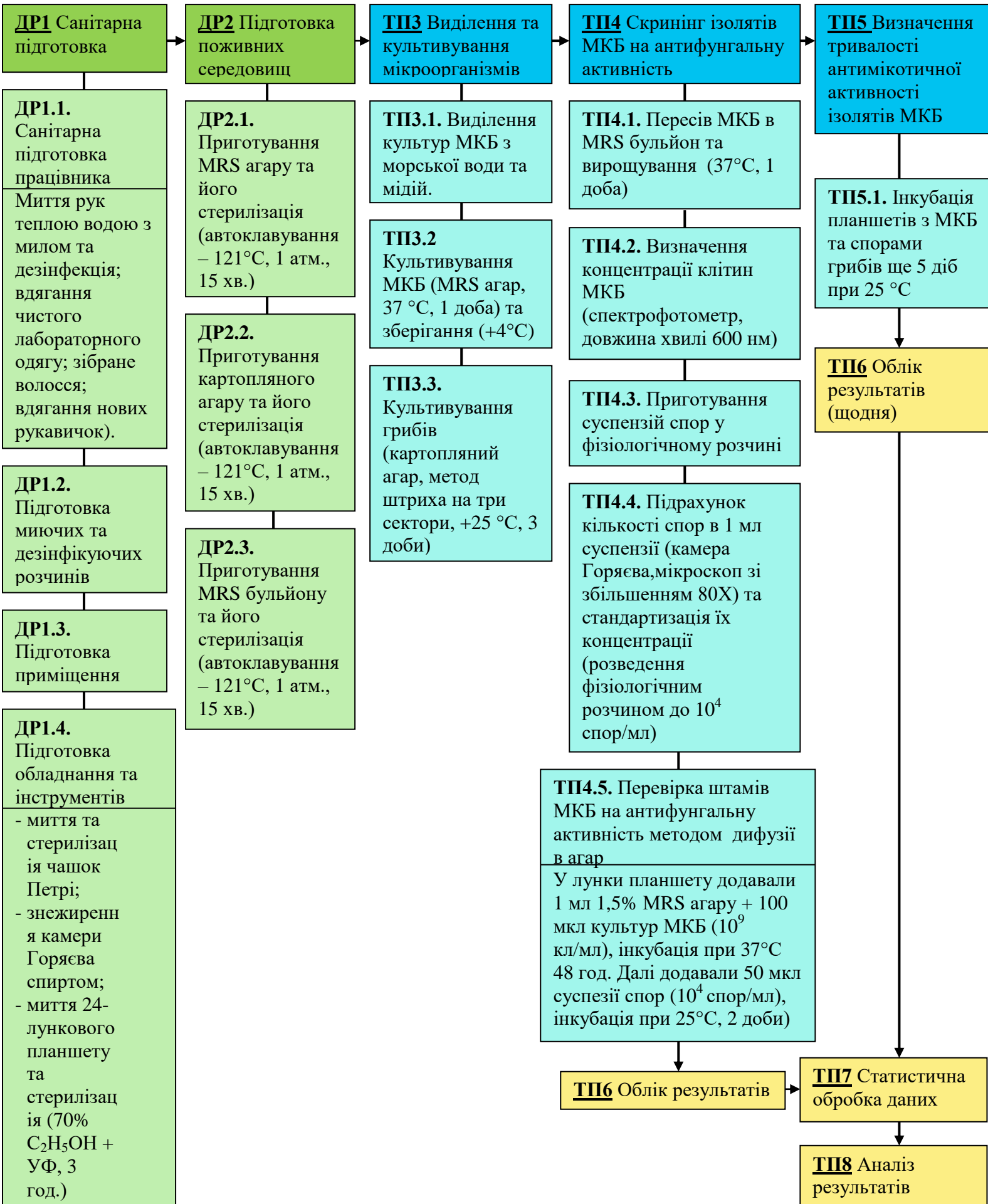
**Рис. 9. Динаміка інгібування спороутворення *A. niger* УКМ F-16706 під дією МКБ із морської води та мідій**

Отже, отримані нами результати свідчать про присутність великої кількості МКБ, які виявляють антимікотичну активність фунгіцидної дії, у воді української акваторії Чорного моря та у складі мікробіоти мідій. Так, вісім ізолятів МКБ з морської води (В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, В.2.3, В.2.4) та один ізолят з мідій (М.4.1) впродовж семи днів повністю інгібували ріст та спороутворення грибів *P. expansum* УКМ F-575 та *A. niger* УКМ F-16706, тобто проявляли фунгіцидну дію. Антифунгальна активність інших ізолятів, що були отримані з ліквору мідій (М.5.1, М.5.2, М.7.1, М.7.2) щодо *P. expansum* УКМ F-575 була низькою та короткочасною. Однак ті ж самі ізоляти показали непогані результати саме щодо пригнічення росту та спороутворення гриба *A. niger* УКМ F-16706: М.5.2, М.7.1 та М.7.2 проявляли фунгіцидну дію шляхом повного інгібування впродовж 7 днів, а М.5.1 – фунгістатичну. Наші результати виявилися навіть кращими за результати отримані в ході дослідження болгарських вчених [Ibryamova et al., 2020], які показали, що проростання спор та ріст колоній грибів *A. niger*, *Penicillium claviforme*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* 8673 та *Candida glabrata* 72 почалися на п'ятий день спільного культивування грибів з лактобактеріями, які були виділені з чорноморських мідій болгарської акваторії.

На нашу думку, у майбутньому необхідно активізувати дослідження морських МКБ не тільки з води та мідій, але й можливо і з інших мешканців Чорного моря, адже отримані нами результати показують, що ці лактобактерії є активними продуцентами антимікотичних сполук, що у перспективі можуть бути використані у харчовій промисловості для захисту їх від псування пліснявими грибами.

У наших майбутніх роботах ми плануємо перевірити антифунгальну активність досліджених ізолятів МКБ з морської води та мідій *in situ*, тобто на поверхні продуктів харчування, з метою розробки біотехнологій захисту харчових продуктів від пліснявих грибів на їх основі.

### 3.3. Біотехнологічна схема скринінгу морських МКБ на антимикотичну активність



Нами було складено схему скринінгу морських МКБ на здатність продукувати антимікотичні сполуки, яка складається з 8 етапів. Кожен етап містить у собі декілька підетапів, які є обов'язковими для даного дослідження та для досягнення необхідних результатів у вигляді антифунгальної активності ізолятів лактобактерій виділених з морського середовища та мідій.

Перший етап – це група допоміжних робіт 1 «Санітарна підготовка», яка містить у собі декілька підетапів: санітарна підготовка працівника, підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовка приміщення, підготовка обладнання та інструментів. Без цих дій неможливими будуть наступні етапи дослідження.

Другий етап – група допоміжних робіт 2 «Підготовка поживних середовищ». Поживні середовища є базовим елементом усіх біотехнологічних досліджень, у зв'язку з цим на схемі представлені три типи поживних середовищ, які є вкрай необхідними для визначення антимікотичної активності морських МКБ.

Для скринінгу морських МКБ на здатність продукувати антимікотичні сполуки обов'язковим є виділення та культивування усіх мікроорганізмів, в тому числі і грибів. Тому третій етап «Виділення та культивування мікроорганізмів» – це перша частина самого технологічного процесу.

Четвертий етап біотехнологічної схеми та одночасно друга частина технологічного процесу це безпосередньо «Скринінг ізолятів МКБ на антифунгальну активність». На цьому етапі обов'язковими є визначення концентрації клітин МКБ, а також концентрації спор грибів та їх стандартизація.

П'ятий – це «Визначення тривалості антимікотичної активності ізолятів МКБ», тобто визначення характеру інгібувальної активності – фунгіцидна чи фунгістатична. Це здійснюється шляхом спільної інкубації МКБ з грибами протягом семи днів.

До технологічного процесу відноситься й «Облік результатів», який здійснюється після другої доби інкубації ізолятів МКБ, виділених з морської води та мідій, з грибами, а також впродовж ще п'ятьох діб.

Надалі здійснюється «Статистична обробка даних» за допомогою програми Microsoft Office Excel.

Восьмим та водночас останнім етапом є «Аналіз результатів», на основі якого і можна зробити висновок про ефективність даної біотехнологічної схеми дослідження та антифунгальну активність морських МКБ проти грибів.

На нашу думку, така біотехнологічна схема у подальшому може бути використана для пошуку МКБ з антифунгальною активністю, яка буде застосована у різних галузях біотехнології: харчовій – для збільшення терміну зберігання харчових продуктів; у медицині – для лікування аспергільозу та інших захворювань, спричинених грибами; в аквакультурі – для захисту риб від патогенних грибів.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено скринінг МКБ з морської води та мідій на здатність інгібувати плісняві гриби, встановлено наявність антимікотичної активності ряду лактобактерій проти *P. expansum* УКМ F-575 та *A. niger* УКМ F-16706 та відібрано найактивніші ізоляти, якими виявилися МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, М.4.1, В.2.3, В.2.4.

2. Вивчено динаміку інгібувальної активності морських лактобактерій на міцелій пліснявих грибів та встановлено, що ізоляти В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, М.4.1, В.2.3, В.2.4 зберігали свою пригнічувальну дію на гриби впродовж семи днів, що свідчить про її фунгіцидний характер.

3. Визначено динаміку пригнічення спороутворення пліснявих грибів лактобактеріями морського походження та показано, що ізоляти МКБ В.1.1, В.1.2, В.1.3, В.1.4, В.1.5, В.1.дк, В.2.3, В.2.4, М.4.1 інгібували утворення спор навіть після 7 днів росту грибів.

4. Розроблено та відпрацьовано біотехнологічну схему скринінгу ізолятів МКБ морського походження на здатність продукувати антифунгальні сполуки, яка складається з восьми основних етапів та показано її ефективність.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни „Загальна мікробіологія та вірусологія” для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / О. Ю. Філімоненко. – Кам'янське: ДДТУ, 2019. – 56 с.
2. Мікробіологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів усіх форм навчання за освітньо-професійною програмою 076 «Підприємництво, торгівля та біржова діяльність» / Т. М. Денисенко. – Чернігів: ЧНТУ, 2019. – 62 с.
3. Робоча програма навчальної практики з дисципліни «Промислова біотехнологія» / В. В. Бородай. – Київ: Національний університет біоресурсів і природокористування України, 2022. – 26 с.
4. Страшнова І. В. Характеристика молочнокислих бактерій губок Чорного моря / І. В. Страшнова, І. О. Ковтун, Н. В. Коротаєва // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – №1. – С. 79 – 94.
5. Abouloifa H. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation / H. Abouloifa, I. Hasnaoui, Y. Rokni, R. Bellaouchi, N. Ghabbour, S. Karboune, M. Brasca, A. Abousalham, B. Jaouadi, E. Saalaoui, A. Asehrou // Advances in Applied Microbiology. – 2022. – V. 120. – P. 33 – 77.
6. Aitzhanova A. Dairy associations for the targeted control of opportunistic *Candida* / A. Aitzhanova, Y. Oleinikova, J. Mounier, N. Hymery, M. Leyva Salas, A. Amangeldi, M. Saubenova, M. Alimzhanova, K. Ashimuly, A. Sadanov // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – V. 37: 143.
7. Alakomi H. L. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane / H. L. Alakomi, E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, I. M. Helander // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 2001–2005.

8. Alonso S. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture / S. Alonso, M. Carmen Castro, M. Berdasco, I.G. de la Banda, X. Moreno-Ventas, A. H. de Rojas // *Probiotics Antimicrob Proteins.* – 2019. – V. 11. – P. 569 – 579
9. Al-Yami A. M. *Lactobacillus* species as probiotics: isolation sources and health benefits / A. M. Al-Yami, A. T. Al-Mousa, S. A. Al-Otaibi, A. Y. Khalifa // *J. Pure Appl. Microbiol.* – 2022. – V. 16 (4). – P. 2270 – 2291.
10. Aryal S. Potato Dextrose Agar (PDA) - Principle, Uses, Composition, Procedure and Colony Characteristics / S. Aryal // *Microbiology Info. com.* – 2022.
11. Assefa A. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish / A. Assefa, F. Abunna // *Vet. Med. Int.* – 2018. – V. 20:5432497
12. Aunbjerg S. D. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt / S. D. Aunbjerg, A. H. Honoré, J. Marcussen, P. Ebrahimi, F. K. Vogensen, C. Benfeldt, T. Skov, S. Knøchel // *Int. J. Food Microbiol.* – 2015. – V. 194. – P. 46–53.
13. Axel C. Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread / C. Axel, B. Brosnan, E. Zannini, A. Furey, A. Coffey, E. K. Arendt // *Int. J. Food Microbiol.* – 2016. – V. 239. – P. 86–94.
14. Babu Prasada G. Carbohydrate utilization profiles of *Lactobacillus* isolates from marine waters of bay of Bengal near Krishnapatnam port, Nellore district, Andhra Pradesh / G. Prasada Babu, Syed Shameer, K. Audiseshamma, P. Naresh, Paramageetham Chinthala // *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 2013. – V. 2. – P. 31 – 34.
15. Bundgaard-Nielsen K. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing / K. Bundgaard-Nielsen, P. V. Nielsen // *J. Food Prot.* – 1996. – V. 59. – P. 268–275.

16. Cabello F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment / F. C. Cabello // *Environ Microbiol.* – 2006. – V. 68. – P. 1137–1144.
17. Cabello F. C. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance / F. C. Cabello, H. P. Godfrey, A. H. Buschmann, H. J. Dölz // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – V. 16. – P. 127–133.
18. Carlson J. M. Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad-spectrum antibiotic / J. M. Carlson, A. B. Leonard, E. R. Hyde, J. F. Petrosino, T. P. Primm // *Infect Drug Resist.* – 2017. – V. 10. – P. 143–154.
19. Chen H. Antifungal activity and mode of action of lactic acid bacteria isolated from kefir against *Penicillium expansum* / H. Chen, H. Ju, Y. Wang, G. Du, X. Yan, Y. Cui, Y. Yuan, T. Yue // *Food Control.* – 2021. – V. 130:108274.
20. Chizhayeva A. Lactic acid bacteria as probiotics in sustainable development of aquaculture / A. Chizhayeva, A. Amangeldi, Y. Oleinikova, A. Alybaeva, A. Sadanov // *Aquat. Living Resour.* – 2022. – V. 35:10.
21. Coda R. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread / R. Coda, A. Cassone, C. G. Rizzello, L. Nionelli, G. Cardinali, M. Gobbetti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 3484–3492.
22. Crowley S. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives / S. Crowley, J. Mahony, D. V. Sinderen // *Trends Food Sci. Technol.* – 2013. – V. 33. – P. 93–109.
23. Dagnas S. Quantifying effect of lactic, acetic, and propionic acids on growth of molds isolated from spoiled bakery products / S. Dagnas, E. Gauvry, B. Onno, J. M. Membre // *J. Food Prot.* – 2015. – V. 78. – P. 1689–1698.

24. Dan A. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of *Paecilomyces hepialid* / A. Dan, Y. Hu, R. Chen, X. Lin, Y. Tian, S. Wang // Food Sci. Human Wellness. – 2021. – V. 10. – P. 401–407.
25. De Man J. C. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* / J. C. De Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe // J. appl. Bact. – 1960. – V. 23 (1). – P. 130-135.
26. De Vuyst L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications / L. De Vuyst, F. Leroy // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 13. – P. 194–199.
27. Françoise L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products / L. Françoise // Food Microbiology. – 2010. – V. 27(6). – P. 698–709.
28. Gasser M. Attributable deaths and disability adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland / M. Gasser, W. Zingg, A. Cassini, A. Kronenberg // Lancet Infect Dis. – 2019. – V. 19. – P. 17–18.
29. Global bakery products industry // ReportLinker. – 2020.
30. Guimarães A. Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum* / A. Guimarães, A. Venancio, L. Abrunhosa // Food Addit. Contam. – 2018a. – V. 359. – P. 1803–1818.
31. Guimarães A. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum* / A. Guimarães, A. Santiago, J. A. Teixeira, A. Venâncio, L. Abrunhosa // Int. J. Food Microbiol. – 2018b. – V. 264. – P. 31–38.
32. Hardy H. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology / H. Hardy, J. Harris, E. Lyon, J. Beal, A. D. Foey // Nutrients. – 2013. – V. 5(6). – P. 1869–1912.
33. 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, D. Dimitrov, Z. Dimitrova, R. Ivanov, K. Kalchev, N. Chipev, N. Natchev, T. Ignatova-Ivanova // Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers). – 2020. – V. 26(1). – P. 2875 – 2882.

34. Ignatova-Ivanova T. Determination of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from the Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 / T. Ignatova-Ivanova, S. Ibryamova, D. Bachvarova, S. Salim, S. Valkova, Y. Simeonova, D. Dimitrov, R. Ivanov, N. Chipev, N. Natchev // *Pharmacia*. – 2022. – V. 69(3). – P. 637–644.
35. 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. Yanagi, Y. Yamamoto, K. Yamasato // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – P. 711–720.
36. Kaban G. Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk) / G. Kaban, M. Kaya // *J. Food Sci.* – 2008. – V. 73. – P. 385–388.
37. Karthikeyan V. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic / V. Karthikeyan, S. W. Santhosh // *Pakistan J. Nutr.* – 2009. – V. 8. – P. 335–340.
38. Kathiresan K. Prospects of lactic acid bacteria of marine origin / K. Kathiresan, G. Thiruneelakandan // *Indian J. Biotechnol.* – 2008. – V. 7(2). – P.170–177.
39. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria / K. Khalid // *Int. J. Biosci.* – 2011. – V. 1. – P. 1–13.
40. Khalil A. A. Lactic acid bacteria as antimycotic and antimycotoxins agents against toxigenic *Fusarium* species associated to maize grains stored in egyptian markets / A. A. Khalil, A. E. Abou-Gabal, A. M. Elfaramawy, A. E. Khaled, A. A. Abdellatef // *J. Pure Appl. Microbiol.* – 2013. – V. 7. – P. 93–105.
41. Kim J.-D. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Aspergillus fumigates* / J.-D. Kim // *Mycobiology*. – 2005. – V. 33(4). – P. 210–214.

42. König H. Lactic acid bacteria / H. König, G. Uden, J. Fröhlich // *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine – Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2009. – 513 p.*
43. Konings W. N. Lactic acid bacteria: the bug of new millennium / W. N. Konings, J. Kok, O. P. Kuiters, V. Poolman // *Curr Opin Microbiol.* – 2000. – V. 3. – P. 107–116.
44. Lan W. T. Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd / W. T. Lan, Y. S. Chen, H. C. Wu, F. Yanagida // *Folia Microbiol.* – 2012. – V. 57. – P. 99–105.
45. Lavermicocca P. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B / P. Lavermicocca, F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, M. Gobetti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 4084–4090.
46. Le Lay C. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria / C. Le Lay, E. Coton, G. Le Blay, J. M. Chobert, T. Haertle, Y. Choiset, N. Nguyen Van Long, L. Meslet-Cladière, J. Mounier // *Int. J. Food Microbiol.* – 2016. – V. 239. – P. 79–85.
47. Leroy F. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation / F. Leroy, J. Verluyten, Luc De Vuyst // *Int. J. Food Microbiol.* – 2006. – V. 106. – P. 270–285.
48. Leyva Salas M. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications / M. Leyva Salas, A. Thierry, M. Lemaître, G. Garric, M. Harel-Oger, M. Chatel, E. Coton // *Frontiers in Microbiology.* – 2018. – V.9:1787.
49. Leyva Salas M. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products / M. Leyva Salas, J. Mounier, M. B. Maillard, F. Valence, E. Coton, A. Thierry // *Food Chem.* – 2019. – V. 301:125260.

50. Liu A. Antifungal mechanisms and application of lactic acid bacteria in bakery products: a review / A. Liu, R. Xu, S. Zhang, Y. Wang, B. Hu, X. Ao, Q. Li, J. Li, K. Hu, Y. Yang, and S. Liu // *Front Microbiol.* – 2022. – V. 13:924398.
51. Lynch K. M. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of cheddar cheese / K. M. Lynch, A. M. Pawlowska, B. Brosnan, A. Coffey, E. Zannini, A. Furey, P. L. H. McSweeney, D. M. Waters, E. K. Arendt // *Int. Dairy J.* – 2014. – V. 34. – P. 167–173.
52. Magnusson J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria / J. Magnusson, K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, J. Schnürer // *FEMS Microbiol. Let.* – 2003. – V. 219. – P. 129–135.
53. Martin H. Synergism between hydrogen peroxide and seventeen acids against five Agri-food-borne fungi and one yeast strain / H. Martin, P. Maris // *J. Appl. Microbiol.* – 2012. – V. 113. – P. 1451–1460.
54. Martirosyan V. Carbon dioxide as a microbial toxicity enhancer of some antibacterial agents: a new potential water purification tool / V. Martirosyan, K. Hovnanyan, S. Ayrapetyan // *Int Scholar Res Notices Article.* – 2012. – V. 2012:906761.
55. Mateo E. M. Lactic Acid Bacteria as Potential Agents for Biocontrol of Aflatoxigenic and Ochratoxigenic Fungi / E. M. Mateo, A. Tarazona, M. Jiménez, F. Mateo // *Toxins (Basel).* – 2022. – V. 14(11).
56. Matevosyan L. Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation / L. Matevosyan, I. Bazukyan, A. Trchounian // *BMC Microbiology.* – 2019. – V. 19. – P. 102.
57. Mauch A. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley / A. Mauch, F. Dal Bello, A. Coffey, E. K. Arendt // *Int J Food Microbiol.* – 2010. – V. 141(1-2). – P. 116–121.
58. McDonald L. C. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria / L. C.

- McDonald, R. F. McFeeters, M. A. Daeschel, H. P. Fleming // *Appl. Environ. Microbiol.* –1987. – V. 53. – P. 1382–1384.
59. Mokoena M. P. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages / M. P. Mokoena, T. Mutanda, A. O. Olaniran // *Food Nutr. Res.* – 2016. – V. 60: 10.3402/fnr.v60.29630.
60. Muhialdin B. J. Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds / B. J. Muhialdin, H. L. Alboory, H. Kadum, N. K. Mohammed, N. Saari, Z. Hassan, A. S. M. Hussin // *Food Control.* – 2020. – V. 109: 106898.
61. Nasrollahzadeh A. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from masske, camel dough, and local yoghurt against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* / A. Nasrollahzadeh, M. Khomeiri, M. Mahmoudi, A. Sadeghi, M. Ebrahimi // *J. Food Hyg.* – 2020. – V. 4. – P. 1–11.
62. Nasrollahzadeh A. Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria / A. Nasrollahzadeh, S. Mokhtari, M. Khomeiri, and Per E. J. Saris // *Foods.* – 2022. – V. 11(3):395.
63. Nehal F. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou / F. Nehal, M. Sahnoun, S. Smaoui, B. Jaouadi, S. Bejar, S. Mohammed // *Microb. Pathog.* – 2019. – V. 132. – P. 10–19.
64. Nes I. E. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria / I. E. Nes, D. B. Diep, L. S. H. Varstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, H. Holo // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1996. – V. 70. – P. 113–128.
65. Nielsen P. V. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from species and herbs, and the possible application in active package, with special emphasis on mustard essential oil / P. V. Nielsen, R. Rios // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – V. 60. – P. 219–229.

66. Nikelsen L. Quantitative risk analysis of aflatoxin toxicity for the consumers of "kenkey"- a fermented maize product / L. Nikelsen, M. Jakobsen // Food Control. – 1997. – V. 8. – P. 149–159.
67. Okocha R. C. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture / R. C. Okocha, I. O. Olatoye, O. B. Adedeji // Public Health Rev. – 2018. – V. 39:21.
68. Oliveira P. M. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products / P. M. Oliveira, E. Zannini, E. K. Arendt // Food Microbiol. – 2014. – V. 37. – P. 78–95.
69. Oliveira P. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: strain characterization and identification of antifungal compounds / P. Oliveira, B. Brosnan, A. Furey, A. Coffey, E. Zannini, E. K. Arendt // Food Control. – 2015. – V. 51. – P. 433–443.
70. Ortiz-Rivera Y. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria / Y. Ortiz-Rivera, R. Sanchez-Vega, N. Gutierrez-Mendez, J. León-Félix, C. Acosta-Muñiz, D. R. Sepulveda // J. Dairy Sci. – 2017. – V. 100. – P. 4258–4268.
71. Pitt J. I. Fungi and Food Spoilage / J. I. Pitt, A. D. Hocking. – Boston: Springer, 2009. – 519 p.
72. Qian M. A review of active packaging in bakery products: applications and future trends / M. Qian, D. Liu, X. Zhang, Z. Yin, B. B. Ismail, X. Ye, M. Guo // Trends Food Sci. Technol. – 2021. – V. 114. – P. 459–471.
73. Reid G. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics / G. Reid, M. E. Sanders, H. R. Gaskins, G. R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut, T. R. Klaenhammer // J. Clin. Gastroenterol. – 2003. – V. 37(2). – P. 105–118.
74. Rico A. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia / A. Rico, T. M. Phu, K. Satapornvanit, J. Min, A. M. Shahabuddin, P. J. G. Henriksson, F.

- J. Murray, D. C. Little, A. Dalsgaard, P. J. Van den Brink // *Aquaculture*. – 2013. – V. 412–413. – P. 231–243.
75. Rodrigues K. L. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract / K. L. Rodrigues, L. R. Caputo, J. C. Carvalho, J. Evangelista, J. M. Schneedorf // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2005. – V. 25. – P. 404–408.
76. Ross P. R. Preservation and fermentation: past, present and future / P. R. Ross, S. Morgan, C. Hill // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – V. 79. – P. 3–16.
77. Russo P. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products / P. Russo, M. P. Arena, D. Fiocco, V. Capozzi, D. Drider, G. Spano // *Int. J. Food Microbiol.* – 2017. – V. 247. – P. 48–54.
78. Ryan L. A. M. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products / L. A. M. Ryan, E. Zannini, F. Dal Bello, A. Pawlowska, P. Koehler, E. K. Arendt // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – V. 146. – P. 276–283.
79. Saladino F. *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement / F. Saladino, C. Luz, L. Manyes, M. Fernández-Franzón, G. Meca // *Food Control*. – 2016. – V. 67. – P. 273–277.
80. Salas M. L. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications / M. L. Salas, A. Thierry, M. Lemaître, G. Garric, M. Harel-Oger, M. Chatel, S. Lê, J. Mounier, F. Valence, E. Coton // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9:1787.
81. Sangmanee P. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* / P. Sangmanee, T. Hongpattarakere // *Food Control*. – 2014. – V. 40. – P. 224–233.

82. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME) / M. Sasser – Technical Note 101. – Newark: MIDI – 2006.
83. Schmidt M. Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin / M. Schmidt, K. M. Lynch, E. Zannini, E. K. Arendt / Food Control. – 2018. – V. 88. – P. 139–148.
84. Sjögren J. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 / J. Sjögren, J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer, L. Kenne // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 7554–7557.
85. Spielmeier S. The lantibiotic mersacidin is an auto-inducing peptide / S. Spielmeier, A. Hoffmann, B. Rudd and G. Bierbaum // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 72. – P. 7270–7277.
86. Ström K. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid / K. Ström, J. Sjögren, A. Broberg., J. Schnürer // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 4322–4327.
87. Sun L. A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread / L. Sun, X. Li, Y. Zhang, W. Yang, G. Ma, N. Ma, Q. Hu, F. Pei // Food Control. – 2020. – V. 109: 106914.
88. Tanwar J. Multidrug resistance: an emerging crisis / J. Tanwar, S. Das, Z. Fatima, S. Hameed // Interdiscip Perspect Infect Dis. – 2014. – 2014: 541340.
89. Van Geel-Schuttená G. H. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides / G. H. Van Geel-Schuttená, F. Flesch, B. ten Brink, M. R. Smith, L. Dijkhuizen // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50. – P. 697–703.
90. Verschuere L. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture / L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – V. 64(4). – P. 655–671.

91. Vimont A. Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt / A. Vimont, B. Fernandez, G. Ahmed, H. P. Fortin, I. Fliss // *Int. J. Food Microbiol.* – 2019. – V. 28. – P. 182–188.
92. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research / J. Walter // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 4985–4996.
93. Yang Z. Antimicrobial activity of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid produced by lactic acid bacteria / Z. Yang, T. Suomalainen, A. Mäyrä-Mäkinen, E. Huttunen // *J. Food Prot.* – 1997. – V. 60. – P. 786–790.
94. Yépez A. Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin / A. Yépez, C. Luz, G. Meca, G. Vignolo, J. Mañes, R. Aznar // *Food Control.* – 2017. – V. 78. – P. 393–400.
95. Zúñiga M. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria / M. Zúñiga, I. Pardo, S. Ferrer // *Int. J. Food Microbiol.* – 1993. – V. 18. – P. 37–42.