

**Г. В. Ямборко, І. В. Страшнова, С. І. Ракитська**Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна,  
e-mail: jamborkoann@ukr.net**ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗБЕРІГАННЯ ШТАМІВ МОЛОЧНО-  
КИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ГІДРОБІОНТІВ  
ЧОРНОГО МОРЯ, РІЗНИМИ МЕТОДАМИ**

Широке використання молочнокислих бактерій (МКБ) у харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості актуалізує проблему вибору оптимальних методів їх тривалого зберігання з мінімальною втратою життєздатності та цінних біотехнологічних властивостей. **Мета роботи** – порівняти ефективність різних методів зберігання штамів МКБ морського походження, виділених із губок *Haliclona* sp. та мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря. **Матеріали і методи.** Досліджено 14 штамів МКБ (*Lentilactobacillus parabuchneri*, *Loigolactobacillus bifermantans*, *Leuconostoc mesenteroides*), які зберігали трьома методами: субкультивуванням, під шаром вазелінової олії та методом низькотемпературного заморожування у MRS-бульйоні з 30% гліцерином. Життєздатність (КУО/см<sup>3</sup>) та основні біологічні властивості оцінювали на початку та через 3, 6, 9 і 12 місяців зберігання. **Результати.** Початкова кількість життєздатних клітин становила  $34,2 \times 10^9$ – $96,3 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Упродовж 12 місяців для всіх способів фіксували поступове зниження життєздатності, проте метод низькотемпературного заморожування забезпечував збереження не менше ніж  $10^7$  КУО/см<sup>3</sup> усіх штамів. Після 9–12 місяців зберігання відмічали зворотні зміни морфології й тінкторіальних властивостей та подовження терміну культивування до 48 год. Активність кислотоутворення при сквашуванні молока знижувалася: рН змінювався з 5,4–6,0 до 5,9–6,6, титрована кислотність – із 42,6–68,2 до 32,5–52,4 °Т. **Висновки.** Для тривалого лабораторного зберігання МКБ морського походження найбільш ефективним є низькотемпературне заморожування, яке забезпечує збереження життєздатності, біологічних властивостей і кислотоутворювальної активності штамів.

*Ключові слова:* методи зберігання, молочнокислі бактерії, морські штамми, біологічні властивості, активність кислотоутворення.

Зберігання мікроорганізмів у колекціях забезпечують збереження ресурсів мікробної різноманітності та роблять їх доступними для використання в наукових дослідженнях. Для тривалого зберігання мікроорганізмів без втрати цінних властивостей застосовують методи, які забезпечують суттєве гальмування життєвих процесів. При цьому потрібно враховувати максимально можливий час зберігання культури та надійність методів [11, 14].



У своїй роботі бактеріологи щодня стикаються із потребою зберігати мікроорганізми протягом тривалого часу для забезпечення життєдіяльності мікробних клітин та чистоти культур, попередження змін їх властивостей і мутацій. Практика консервації та розконсервації мікроорганізмів дала змогу напрацювати низку емпіричних заходів, заснованих на знанні механізмів занурення клітин у анабіотичний стан та виходу з нього. Однак ефективна консервація з повним збереженням популяцій і геномів різноманітних мікроорганізмів є поки що не вирішеною проблемою, яка потребує подальшого вивчення [4, 11, 15].

Актуальним залишається питання збереження життєздатності й активності досить численної групи молочнокислих бактерій (МКБ). Здавна ці бактерії були і залишаються об'єктами науково-практичних досліджень мікробіологів і біотехнологів. МКБ використовуються у багатьох галузях харчової і фармацевтичної промисловості як заквасочні та/або пробіотичні культури [9, 10].

Окрім молочної кислоти, як основного продукту метаболізму, молочнокислі бактерії синтезують інші цінні метаболіти, що зумовлює їх використання у біотехнологіях. Однак ці бактерії є досить вибагливими як щодо культивування, так і до збереження життєздатності й метаболічної активності в лабораторних умовах. Тому дослідження наявних і розробка нових методів для забезпечення життєздатності та розширеної функціональності культур молочнокислих бактерій у лабораторних умовах має дуже важливе значення [16, 17].

Серед МКБ багатообіцяючими є перспективи використання культур, ізольованих з морського середовища. Ці бактерії, адаптовані до екстремальних умов морського середовища (висока солоність, низькі температури, високий тиск), характеризуються значною генетичною та біохімічною різноманітністю та є потенційним джерелом унікальних біоактивних сполук, які не продукують їхні наземні аналоги [12].

Метою роботи було дослідити ефективність зберігання штамів молочнокислих бактерій, виділених із гідробіонтів Чорного моря, різними методами. В завдання дослідження входило:

1. Визначити кількість життєздатних клітин молочнокислих бактерій видів *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Loigolactobacillus bif fermentans* і *Leuconostoc mesenteroides* на початку і протягом 12 місяців зберігання методами субкультивування, під шаром вазелінової олії та низькотемпературного заморожування.

2. Дослідити культуральні, морфологічні, тінкторіальні і фізіолого-біохімічні властивості бактерій штамів молочнокислих бактерій на початку і протягом 12-місячного періоду зберігання.

3. Визначити активність кислотоутворення у досліджуваних штамів молочнокислих бактерій на початку і через 12 місяців зберігання методом низькотемпературного заморожування.

### Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були 14 штамів молочнокислих бактерій із Колекції морських та корисних для екологічної біотехнології штамів мікроорганізмів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. МКБ були виділені із морського середовища у 2019 р.: 12 штамів – із губок *Haliclona sp.*, 2 штами – із мідій *Mytilus galloprovincialis*. На основі вивчення біологічних властивостей культури виділених бактерій віднесено до видів 7 штамів *Lentilactobacillus parabuchneri* (*L. parabuchneri* МЛБ 8\_2а, МЛБ 10\_1, МЛБ 19\_2б, МЛБ 25\_1, МЛБ 25\_2, МЛБ 39\_1а, МЛБ 52\_2а), 5 штамів *Loigolactobacillus bifermentans* (*L. bifermentans* МЛБ 10\_2, МЛБ 19\_2а, МЛБ 52\_1б, МЛБ 53\_1, МЛБ 68\_1а) [6] і 2 штами *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides* LM 30, LM 31) [1, 6].

Штами МКБ закладено на зберігання: 1) методом субкультивування (періодичних пересівів на скошене свіжоприготоване живильне середовище MRS у пробірках) при 4 °С; 2) під шаром вазелінової олії у стовпчику середовища MRS у пробірках при 4 °С; 3) у рідкому середовищі MRS з гліцерином (кінцева концентрація гліцерину 30,0%) у кріопробірках при -84 °С.

Життєздатність та біологічні властивості культур досліджували на початку зберігання, через 3, 6, 9 і 12 місяців.

Для визначення кількості життєздатних клітин МКБ при зберіганні усіма зазначеними методами готували суспензії бактерій відповідних штамів за стандартом мутності Макфарланда ( $1,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>), потім, використовуючи метод серійних розведень, готували робочі розведення ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ), 0,1 см<sup>3</sup> яких висівали на чашки із агаризованим середовищем MRS. Посіви культивували при 37 °С протягом 24–48 год. Облік результатів проводили, підраховуючи кількість колонієутворювальних одиниць [2, 3].

Кожного разу, визначаючи життєздатність закладених на зберігання культур, визначали їх бактеріологічну чистоту. Для цього досліджували одностипність і морфологічні ознаки колоній, що виростили на агаризованому середовищі MRS; характер росту у рідкому середовищі MRS; тінкторіальні властивості при забарвлюванні за методом Грама; біохімічні властивості (каталазну та оксидазну активності, здатність до утворення індолу, сірководню, нітратредукції, окиснення/ферментації глюкози).

Здатність утворювати органічні кислоти оцінювали за активною і граничною кислотністю [3].

Визначення граничної кислотності проводили титриметричним методом і виражали у градусах Тернера. Культури досліджуваних штамів засівали в стерильне знежирене молоко (0,25 см<sup>3</sup> суспензії культури відповідного штаму у титрі  $10^8$  КУО/см<sup>3</sup> у 5,0 см<sup>3</sup> молока) та інкубували 24 год при температурі 37 °С. Визначення було засноване на титруванні кислот, що виділяються МКБ у середовище культивування, розчином NaOH. Точку еквівалентності встановлювали за допомогою індикатора фенолфталеїну. Один °Т відповідав 1 см<sup>3</sup> 0,1 М розчину NaOH, що використано на нейтралізацію суміші. Кількість луку, яка пішла на титрування, визначали за поділками бюретки та розраховували кислотність за стандартною формулою [3].



Визначення активної кислотності проводили потенціометричним методом з використанням рН-метра SX811. Вимірювання рН проводили після 24 годинного культивування досліджуваних штамів у стерильному знежиреному молоці при 37 °С.

Дослідження виконувалися у трикратному повторі. Достовірність результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю  $p < 0,05$ . Для аналізу результатів проведено описову статистику, яку здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2016.

### Результати та їх обговорення

Із урахуванням специфічних джерел виділення (гідробіонти Чорного моря) досліджуваних штамів МКБ доцільним було з'ясувати, які методи зберігання дозволяють забезпечити виживання значної кількості їх клітин у лабораторних умовах.

Усі штами МКБ були закладені на зберігання трьома методами: субкультивуванням і під шаром вазелінової олії на MRS-агарі при 4 °С; у MRS-бульйоні з гліцерином при -84 °С.

Перед початком зберігання вивчали основні біологічні властивості штамів МКБ і кількість життєздатних клітин.

У таблиці 1, як приклад, наведено результати вивчення морфологічних і культуральних властивостей бактерій штамів *Lentilactobacillus parabuchneri* МЛБ 25\_1, *Loigolactobacillus bifermentans* МЛБ 52\_16 і *Leuconostoc mesenteroides* LM 30, які є представниками трьох досліджених видів.

Штами виду *Lentilactobacillus parabuchneri* (*L. parabuchneri* МЛБ 8\_2а, МЛБ 10\_1, МЛБ 19\_2б, МЛБ 25\_1, МЛБ 25\_2, МЛБ 39\_1а, МЛБ 52\_2а) на агаризованому живильному середовищі MRS утворювали невеликі до 2 мм діаметром слизові, білі або напівпрозорі округлі колонії. Клітини цих штамів мали форму паличок, що суттєво відрізнялися за довжиною (від довгих до коротких, що нагадували кокобацили) і розташуванням у препаратах (від поодиноких клітин до скупчень). Клітини забарвлювалися у фіолетовий колір при забарвленні за Грамом (тобто були грампозитивними), не утворювали спор, цист і капсул. Ріст штамів цього виду у рідкому середовищі MRS був добре вираженим в усьому об'ємі середовища і характеризувався значним помутнінням.

Так само як штами *L. parabuchneri*, представники виду *Loigolactobacillus bifermentans* (штами *L. bifermentans* МЛБ 10\_2, МЛБ 19\_2а, МЛБ 52\_16, МЛБ 53\_1, МЛБ 68\_1а) добре росли як на щільному, так і у рідкому середовищі MRS, утворюючи на MRS-агарі, як правило, округлі (до 2,5 мм діаметром) блискучі напівпрозорі або білі колонії; у MRS-бульйоні – значне помутніння та осад.

Клітини досліджених штамів *L. bifermentans* також характеризувалися вираженим поліморфізмом. За даними літературних джерел [16, 17], морфологічне різноманіття є досить поширеним явищем серед представників родини *Lactobacillaceae*. Клітини досліджених штамів були грампозитивними, але з віком інтенсивність забарвлення зменшувалася, у порівнянні з молодими культурами.

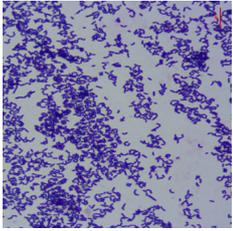
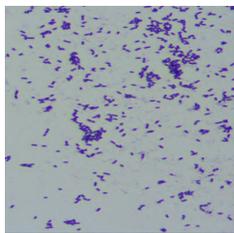
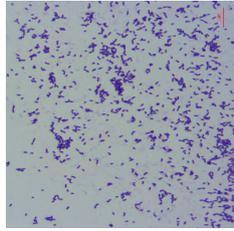
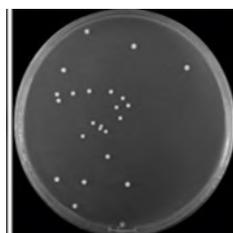
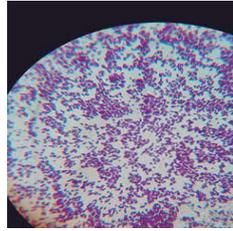


Таблиця 1

Table 1

## Морфологічні та культуральні властивості досліджених МКБ

## Morphological and cultural properties of the studied LAB

Штам	Ознаки/Властивості	Колонії на середовищі MRS	Морфологія клітин (збільшення x1000)
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> МЛБ 25_1	Колонії 1,5–2 мм, округлі, білі, блискучі. Клітини – паличкоподібні (0,8–1,0 × 1,5–2,5 мкм), грампозитивні, в препаратах зустрічалися поодинокі, парами або ланцюжками.		
<i>Loigolactobacillus bifermians</i> МЛБ 52_16	Колонії 1,8–2,3 мм, округлі, блискучі, білі. Клітини – грампозитивні нерухомі палички неправильної форми з закругленими або звуженими кінцями (0,5–1,0 × 1,3–2,0 мкм), розташовувалися поодинокі, парами або скупченнями.		
<i>Leiconostoc mesenteroides</i> ЛМ 30	Колонії 0,8–1,0 мм, округлі, блискучі, кремові. Клітини – нерухомі коки (0,5–0,8 мкм), грампозитивні, розташовувалися попарно чи короткими ланцюжками.		

Штами *L. parabuchneri* і *L. bifermentans* мали схожі досліджені біохімічні властивості: були каталазо- і оксидазонегативними; не відновлювали нітрати; споживали глюкозу в аеробних і анаеробних умовах; не утворювали індол і сірководень.

При дослідженні штамів *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides* LM 30, LM 31) встановлено, що вони добре ростуть на MRS-агарі, утворюючи дрібні до 1,2 мм діаметром молочні, блискучі колонії, і завдяки утворенню летких сполук (за даними літератури [5, 8, 19], швидше за все, це може бути діацетил) мали приємний запах вершкового масла. У MRS-бульйоні спостерігали рівномірне помутніння дещо слизової консистенції. У забарвлених за методом Грама препаратах відзначали наявність грампозитивних клітин, кулястої або лінзовидної форми, розташованих попарно чи короткими ланцюжками, що нагадували ланцюжки стрептококів. Не утворювали спор, цист і капсул. Визначені біохімічні властивості показали відсутність каталазної, оксидазної і нітратредуктазної активності, здатність до окиснення і ферментації глюкози з утворенням газу, не спроможність до утворення індолу і сірководню.

Кількість життєздатних бактерій усіх досліджених штамів була високою і коливалася від  $34,2 \pm 6,9 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (визначено для штаму *L. parabuchneri* МЛБ 39\_1а) до  $96,3 \pm 5,1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (визначено для штаму *L. bifermentans* МЛБ 68\_1а) (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість життєздатних клітин штамів МКБ на початку зберігання

Table 2

Quantity of viable cells of LAB strains at the beginning of storage

Штам	Кількість життєздатних клітин ( $\times 10^9$ , КУО/см <sup>3</sup> )	Штам	Кількість життєздатних клітин ( $\times 10^9$ , КУО/см <sup>3</sup> )
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 8_2а	41,2 ± 3,5	<i>L. bifermentans</i> МЛБ 10_2	61,6 ± 2,9
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 10_1	54,2 ± 4,1	<i>L. bifermentans</i> МЛБ 19_2а	74,4 ± 5,1
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 19_2б	37,8 ± 7,8	<i>L. bifermentans</i> МЛБ 52_1б	59,7 ± 4,9
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_1	43,4 ± 5,1	<i>L. bifermentans</i> МЛБ 53_1	59,4 ± 5,2
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_2	52,5 ± 4,6	<i>L. bifermentans</i> МЛБ 68_1а	96,3 ± 5,1
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 39_1а	34,2 ± 6,9	<i>L. mesenteroides</i> LM 30	60,7 ± 4,3
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 52_2а	39,8 ± 3,5	<i>L. mesenteroides</i> LM 31	59,8 ± 4,7

Порівнюючи показник життєздатних клітин для штамів трьох видів МКБ, зауважимо, що кращу життєздатність в однакових (уніфікованих) лабораторних умовах (температура і час культивування – 37 °С, 24 год, середовище для культивування – MRS) проявили штамми виду *L. bifermentans*.



Кількість життєздатних бактерій штамів цього виду коливалася від  $59,4 \pm 5,2 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (визначено для *L. bif fermentans* МЛБ 53\_1) до  $96,3 \pm 5,1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (визначено для *L. bif fermentans* МЛБ 68\_1a). Досить високу життєздатність проявили також штами виду *L. mesenteroides*. При чому кількість життєздатних бактерій обидвох штамів була приблизно  $60 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Найменша життєздатність в лабораторних умовах встановлена для штамів *L. parabuchneri*. Кількість життєздатних бактерій штамів цього виду не перевищувала  $54,2 \pm 4,1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (у *L. parabuchneri* МЛБ 10\_1).

Через 3 місяці зберігання усіма використаними методами кількість життєздатних клітин усіх штамів МКБ дещо знизилася (табл. 3). Але якщо кількість життєздатних клітин паличкоподібних МКБ (представники родів *Lentilactobacillus* і *Loigolactobacillus*) з використанням усіх методів встановлена на рівні  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, то кулеподібні бактерії (*Leuconostoc mesenteroides*) життєздатність на такому рівні демонстрували при збереженні методами субкультивування і низькотемпературного заморожування.

При зберіганні під шаром вазелінової олії вже через 3 місяці кількість життєздатних клітин *L. mesenteroides* LM 30 і LM 31 зменшувалася на 2 порядки, у порівнянні з цим показником перед початком зберігання. Зауважимо, що через цей проміжок часу усі штами МКБ зберегли незмінними основні біологічні властивості.

Через 6 місяців зберігання методами субкультивування і низькотемпературного заморожування кількість життєздатних клітин бактерій видів *L. parabuchneri* і *L. bif fermentans* несуттєво зменшилася, порівнюючи з цим показником на початку зберігання і через 3 місяці зберігання (табл. 2, 3). Значно гірші показники були отримані при визначенні кількості життєздатних клітин МКБ при зберіганні під шаром вазелінової олії. Так, для штамів виду *L. parabuchneri* цей показник визначений у межах  $44,6 \pm 4,2 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. parabuchneri* МЛБ 10\_1) –  $47,1 \pm 3,9 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. parabuchneri* МЛБ 39\_1a); для штамів виду *L. bif fermentans* – у межах  $12,7 \pm 2,9 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. bif fermentans* МЛБ 10\_2) –  $16,6 \pm 2,9 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. bif fermentans* МЛБ 19\_2a). При цьому, незважаючи на збільшення терміну культивування (до 48 год), основні біологічні властивості залишилися незмінними.

Досить показовими були результати, отримані через 9 місяців зберігання штамів МКБ. При зберіганні субкультивуванням через 9 місяців кількість життєздатних бактерій визначена на рівні  $10^8$  КУО/см<sup>3</sup>.

Найменшу кількість життєздатних клітин визначено для штаму *L. parabuchneri* МЛБ 39\_1a ( $44,5 \pm 5,1 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>). Відмічали як подовжений термін культивування (для окремих штамів більше 48 год), так і певні зміни морфологічних ознак у бактерій видів *L. parabuchneri* і *L. bif fermentans*.

Значно зменшилася кількість життєздатних клітин бактерій усіх штамів при зберіганні під шаром вазелінової олії. У найбільш чутливих штамів (*L. parabuchneri* МЛБ 25\_1, МЛБ 39\_1a, МЛБ 52\_2a, *L. bif fermentans* МЛБ 19\_2a, МЛБ 52\_16, МЛБ 53\_1 і *L. mesenteroides* LM 30) кількість бактерій, що вижили, була на рівні  $10^5$  КУО/см<sup>3</sup>. Попри те, що життєздатність бактерій усіх штамів суттєво знизилася при зберіганні цим способом, од-



Таблиця 3

Table 3

Кількість життєздатних клітин МКБ (КУО/см<sup>3</sup>) у процесі зберігання різними способамиQuantity of viable LAB cells (CFU/cm<sup>3</sup>) during storage using different methods

Штам	Субкультивування				Під шаром вазелінової олії				Низькотемпературне заморожування			
	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 8_2а	40,3±3,6 x 10 <sup>9</sup>	32,8±2,7 x 10 <sup>9</sup>	42,4±3,6 x 10 <sup>8</sup>	23,1±4,0 x 10 <sup>6</sup>	43,6±4,8 x 10 <sup>8</sup>	37,3±3,8 x 10 <sup>7</sup>	30,1±2,6 x 10 <sup>6</sup>	23,7±2,6 x 10 <sup>5</sup>	40,5±2,7 x 10 <sup>9</sup>	40,4±3,2 x 10 <sup>9</sup>	38,6±4,0 x 10 <sup>8</sup>	65,6±3,2 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 10_1	54,0±4,0 x 10 <sup>9</sup>	24,8±3,6 x 10 <sup>9</sup>	9,3±3,6 x 10 <sup>9</sup>	12,4±4,8 x 10 <sup>8</sup>	11,2±3,0 x 10 <sup>9</sup>	44,6±4,2 x 10 <sup>8</sup>	86,8±4,4 x 10 <sup>6</sup>	14,8±2,6 x 10 <sup>6</sup>	54,2±3,8 x 10 <sup>9</sup>	49,2±4,1 x 10 <sup>9</sup>	49,4±3,9 x 10 <sup>9</sup>	67,5±4,3 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 19_26	35,5±4,3 x 10 <sup>9</sup>	66,9±2,8 x 10 <sup>8</sup>	21,7±2,9 x 10 <sup>8</sup>	23,3±4,2 x 10 <sup>6</sup>	35,6±4,5 x 10 <sup>8</sup>	44,1±3,9 x 10 <sup>7</sup>	12,6±3,3 x 10 <sup>6</sup>	53,9±2,9 x 10 <sup>5</sup>	38,0±4,4 x 10 <sup>9</sup>	36,8±4,0 x 10 <sup>9</sup>	55,6±4,7 x 10 <sup>8</sup>	45,8±3,2 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_1	36,2±4,2 x 10 <sup>9</sup>	9,4±3,8 x 10 <sup>9</sup>	47,5±3,9 x 10 <sup>8</sup>	33,0±3,6 x 10 <sup>6</sup>	34,7±5,1 x 10 <sup>8</sup>	45,6±4,4 x 10 <sup>7</sup>	97,2±4,8 x 10 <sup>5</sup>	44,5±4,3 x 10 <sup>5</sup>	43,0±2,9 x 10 <sup>9</sup>	40,8±3,4 x 10 <sup>9</sup>	32,1±4,2 x 10 <sup>9</sup>	58,3±2,9 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_2	46,2±4,0 x 10 <sup>9</sup>	34,5±4,4 x 10 <sup>9</sup>	67,7±4,8 x 10 <sup>8</sup>	10,3±3,9 x 10 <sup>8</sup>	49,2±4,9 x 10 <sup>8</sup>	62,1±3,3 x 10 <sup>7</sup>	42,9±4,4 x 10 <sup>6</sup>	34,3±3,6 x 10 <sup>5</sup>	52,1±4,0 x 10 <sup>9</sup>	44,4±2,3 x 10 <sup>9</sup>	42,9±2,3 x 10 <sup>9</sup>	61,8±3,8 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 39_1а	24,6±4,7 x 10 <sup>9</sup>	12,7±4,4 x 10 <sup>9</sup>	44,5±5,1 x 10 <sup>7</sup>	9,3±6,5 x 10 <sup>7</sup>	35,9±7,0 x 10 <sup>8</sup>	47,1±3,9 x 10 <sup>6</sup>	26,8±5,1 x 10 <sup>5</sup>	34,8±4,9 x 10 <sup>4</sup>	30,1±5,6 x 10 <sup>9</sup>	23,7±4,6 x 10 <sup>9</sup>	56,9±5,6 x 10 <sup>8</sup>	37,8±5,4 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 52_2а	35,5±2,9 x 10 <sup>9</sup>	7,6±3,3 x 10 <sup>9</sup>	43,1±3,6 x 10 <sup>8</sup>	13,9±3,9 x 10 <sup>7</sup>	25,5±3,4 x 10 <sup>8</sup>	69,4±3,8 x 10 <sup>6</sup>	44,7±3,2 x 10 <sup>5</sup>	39,1±2,8 x 10 <sup>4</sup>	38,2±3,9 x 10 <sup>9</sup>	35,0±3,7 x 10 <sup>9</sup>	28,7±3,5 x 10 <sup>9</sup>	44,1±4,6 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. bifementans</i> МЛБ 10_2	59,4±2,9 x 10 <sup>9</sup>	10,3±3,6 x 10 <sup>9</sup>	78,6±5,2 x 10 <sup>8</sup>	15,9±4,5 x 10 <sup>8</sup>	37,2±2,9 x 10 <sup>9</sup>	12,7±2,9 x 10 <sup>8</sup>	19,3±5,2 x 10 <sup>6</sup>	81,6±2,9 x 10 <sup>4</sup>	54,4±2,1 x 10 <sup>9</sup>	53,1±3,4 x 10 <sup>9</sup>	50,4±3,39 x 10 <sup>9</sup>	68,8±3,7 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. bifementans</i> МЛБ 19_2а	57,8±3,4 x 10 <sup>9</sup>	92,4±3,6 x 10 <sup>8</sup>	11,9±3,6 x 10 <sup>8</sup>	86,2±3,1 x 10 <sup>7</sup>	67,5±2,4 x 10 <sup>8</sup>	16,6±2,5 x 10 <sup>7</sup>	43,1±4,7 x 10 <sup>5</sup>	9,2±3,5 x 10 <sup>4</sup>	72,3±2,7 x 10 <sup>9</sup>	68,7±3,1 x 10 <sup>9</sup>	64,9±2,3 x 10 <sup>9</sup>	87,7±3,3 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. bifementans</i> МЛБ 52_16	44,2±4,8 x 10 <sup>9</sup>	20,7±3,9 x 10 <sup>9</sup>	31,5±3,9 x 10 <sup>8</sup>	30,9±4,5 x 10 <sup>7</sup>	36,3±4,9 x 10 <sup>8</sup>	44,7±2,6 x 10 <sup>7</sup>	16,6±4,1 x 10 <sup>5</sup>	34,7±3,8 x 10 <sup>4</sup>	55,9±3,7 x 10 <sup>9</sup>	50,7±4,0 x 10 <sup>9</sup>	46,2±3,6 x 10 <sup>9</sup>	44,3±4,1 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. bifementans</i> МЛБ 53_1	36,8±2,6 x 10 <sup>9</sup>	10,5±3,1 x 10 <sup>9</sup>	35,4±2,8 x 10 <sup>8</sup>	27,4±3,3 x 10 <sup>7</sup>	30,6±3,8 x 10 <sup>8</sup>	42,9±3,5 x 10 <sup>7</sup>	88,5±4,1 x 10 <sup>5</sup>	16,9±3,8 x 10 <sup>4</sup>	57,7±2,1 x 10 <sup>9</sup>	51,6±3,4 x 10 <sup>9</sup>	50,2±2,5 x 10 <sup>9</sup>	50,9±4,8 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. bifementans</i> МЛБ 68_1а	70,2±4,3 x 10 <sup>9</sup>	28,6±3,2 x 10 <sup>9</sup>	43,5±3,4 x 10 <sup>8</sup>	28,4±2,9 x 10 <sup>7</sup>	8,9±3,9 x 10 <sup>9</sup>	91,2±2,8 x 10 <sup>7</sup>	17,7±4,3 x 10 <sup>6</sup>	97,8±3,8 x 10 <sup>3</sup>	94,0±3,4 x 10 <sup>9</sup>	84,7±4,5 x 10 <sup>9</sup>	63,8±2,7 x 10 <sup>9</sup>	77,4±2,3 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. mesenteroides</i> LM 30	23,7±2,3 x 10 <sup>9</sup>	57,8±3,6 x 10 <sup>8</sup>	12,2±3,7 x 10 <sup>8</sup>	61,0±3,7 x 10 <sup>7</sup>	44,1±4,1 x 10 <sup>7</sup>	60,9±3,7 x 10 <sup>6</sup>	49,4±2,9 x 10 <sup>5</sup>	68,8±3,0 x 10 <sup>4</sup>	54,9±3,9 x 10 <sup>9</sup>	51,6±2,2 x 10 <sup>9</sup>	48,5±4,8 x 10 <sup>9</sup>	15,1±2,7 x 10 <sup>7</sup>
<i>L. mesenteroides</i> LM 31	32,7±2,8 x 10 <sup>9</sup>	15,4±3,1 x 10 <sup>9</sup>	44,1±4,3 x 10 <sup>8</sup>	46,7±2,9 x 10 <sup>7</sup>	23,7±2,3 x 10 <sup>7</sup>	51,4±2,9 x 10 <sup>6</sup>	10,1±3,4 x 10 <sup>6</sup>	12,7±2,5 x 10 <sup>5</sup>	50,6±3,2 x 10 <sup>9</sup>	47,7±2,7 x 10 <sup>9</sup>	38,1±2,7 x 10 <sup>9</sup>	5,3±4,6 x 10 <sup>7</sup>



нак показник кількості життєздатних клітин бактерій видів *L. bifementans* і *L. mesenteroides* був меншим, ніж у *L. parabuchneri*.

На наш погляд, це пов'язано із фізіологічними властивостями представників цих видів. Будучи анаеробами представники виду *L. parabuchneri* краще зберігаються під шаром вазелінової олії, ніж факультативно-анаеробні бактерії видів *L. bifementans* і *L. mesenteroides*, у яких життєві процеси при такому способі зберігання або дуже гальмуються, або взагалі найбільш слабкі клітини, які є в кожній популяції бактерій, гинуть. При значному зменшенні кількості життєздатних клітин мова не може йти про аутентичність популяції клітин певного штаму, оскільки відбувається свого роду селекція, коли виживають найсильніші/найбільш життєздатні, а інші, слабші, члени мікробної популяції відмирають.

При низькотемпературному зберіганні через 9 місяців лише у двох штамів (*L. parabuchneri* МЛБ 8\_2а і *L. parabuchneri* МЛБ 19\_2б) кількість життєздатних бактерій зменшилася до рівня  $10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, життєздатність інших штамів зменшилася мало у порівнянні із життєздатністю до початку зберігання, і визначена на рівні  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Гарний ріст усіх бактерій усіх штамів відмічали через 48 год культивування, морфологічні, культуральні і фізіолого-біохімічні властивості були подібні до таких на початку культивування.

Через 12 місяців зберігання методом субкультивування кількість життєздатних бактерій усіх штамів коливалася від  $23,1 \pm 4,0 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> (визначено для *L. parabuchneri* МЛБ 8\_2а) до  $15,9 \pm 4,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup> (для *L. bifementans* МЛБ 10\_2). Порівнюючи із показником кількості життєздатних клітин на початку зберігання, через 12 місяців при зберіганні субкультивуванням цей показник для більшості штамів зменшився на 1–2 порядки, для трьох штамів *L. parabuchneri*: МЛБ 8\_2а, МЛБ 10\_1 і МЛБ 25\_1 – на 3 порядки. Щодо основних біологічних властивостей, то спостерігали таку ж картину, як і після 9 місяців: тобто відмічали певні зміни морфологічних і тінкторіальних властивостей. Окрім цього, відзначали уповільнення протікання біохімічних реакцій з інколи варіабельними результатами. Варто зазначити, що усі досліджені властивості відновлювалися, тобто поверталися до початкових, після декількох пересівів на свіжі живильні середовища.

При зберіганні під шаром вазелінової олії кількість життєздатних клітин бактерій усіх штамів суттєво зменшилася, навіть порівнюючи із кількістю живих клітин через 9 місяців. Більш ніж для половини штамів показник життєздатності не перевищував  $10^4$  КУО/см<sup>3</sup>, а для штаму *L. bifementans* МЛБ 68\_1а був ще меншим і склав  $97,8 \pm 3,8 \times 10^3$  КУО/см<sup>3</sup>.

Досить високою залишилася кількість життєздатних клітин бактерій усіх штамів через 12 місяців при низькотемпературному заморожуванні. Для усіх штамів цей показник визначений на рівні  $10^7$  КУО/см<sup>3</sup>. Однак, порівнюючи отримані дані з результатами попередніх перевірок (через 3, 6 і 9 місяців), відзначимо зниження життєздатності: кількість життєздатних клітин зменшилася на 2 порядки. На наш погляд, причиною цього стали часті випадки відключення світла у період досліджень, яке призвело до значних коливань температур у холодильнику, що згубно позначилося на життєздатності клітин і призвело до загибелі частини найбільш слабких із них. Коливання темпе-



ратури, коли показники багаторазово підіймаються до критичних значень і знову опускаються, призводить до постійної зміни стану води в мікробній клітині при внутрішньоклітинному утворенні льоду, який руйнує/травмує структурні компоненти клітин. Тим не менше, даний спосіб зберігання навіть в критичних умовах таких примхливих бактерій, як МКБ, зарекомендував себе як найбільш сприятливий та прийнятний. Отримані нами результати підтверджуються даними інших дослідників, які свідчать про ефективність даного способу при довготривалому зберіганні мікроорганізмів різних систематичних груп, у тому числі МКБ [14, 16].

Отже, для тривалого зберігання МКБ, виділених із морського середовища, в лабораторних умовах, можемо рекомендувати метод низькотемпературного заморожування; для нетривалого зберігання (наприклад, при проведенні експериментальних досліджень) – метод субкультивування.

Одними із основних продуктів метаболізму МКБ є органічні кислоти, і передусім, молочна, які відіграють значну, а часто визначальну, роль у прояві антагоністичних властивостей. Активність кислотоутворення в досліджуваних штамів МКБ визначали за показниками активної і титрованої кислотності, використовуючи стерильне знежирене молоко як субстрат. Отримані результати наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

**Активність кислотоутворення штамами МКБ на початку і через 12 місяців зберігання**

Table 4

**Acid-forming activity of LAB strains at the beginning and after 12 months of storage**

Штам	На початку зберігання		Через 12 місяців зберігання	
	pH	°T	pH	°T
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 8_2a	5,5	63,0 ± 0,2	6,0	44,1 ± 0,1
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 10_1	5,4	63,2 ± 0,2	6,0	46,2 ± 0,2
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 19_26	5,4	63,3 ± 0,1	6,1	43,7 ± 0,2
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_1	5,6	58,6 ± 0,2	6,5	37,5 ± 0,2
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 25_2	5,5	62,7 ± 0,2	6,3	41,5 ± 0,2
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 39_1a	6,0	42,6 ± 0,1	6,6	32,7 ± 0,1
<i>L. parabuchneri</i> МЛБ 52_2a	5,4	64,0 ± 0,1	5,9	47,0 ± 0,2
<i>L. bifermantans</i> МЛБ 10_2	5,8	47,6 ± 0,1	6,6	32,5 ± 0,1
<i>L. bifermantans</i> МЛБ 19_2a	5,4	61,8 ± 0,1	5,9	46,8 ± 0,1
<i>L. bifermantans</i> МЛБ 52_16	5,5	62,9 ± 0,1	5,9	48,0 ± 0,1
<i>L. bifermantans</i> МЛБ 53_1	5,4	64,5 ± 0,2	5,7	52,1 ± 0,2
<i>L. bifermantans</i> МЛБ 68_1a	5,5	59,7 ± 0,2	6,3	41,9 ± 0,1
<i>L. mesenteroides</i> LM 30	5,5	68,2 ± 0,2	6,0	45,6 ± 0,2
<i>L. mesenteroides</i> LM 31	5,4	63,7 ± 0,2	5,8	52,4 ± 0,2



На початку зберігання значення активної кислотності (рН) при зброджуванні молока бактеріями усіх досліджених штамів визначено у межах 5,4–6,0. Значення титрованої кислотності згустку складало від  $42,6 \pm 0,1$  °Т до  $68,2 \pm 0,2$  °Т в залежності від досліджуваного штаму. Отримані дані узгоджуються із даними науковців ОНУ при дослідженні властивостей МКБ (зокрема і цих штамів) відразу після виділення із морських гідробіонтів [6]. За даними О. Й. Цісарик та колег [2018], показники титрованої кислотності від 40 °Т до 70 °Т свідчать про незначну кислотоутворювальну активність продуцентів [7].

Найбільша кислотоутворювальна активність встановлена для штаму *L. mesenteroides* LM 30: при сквашуванні молока активна кислотність становила 5,5, титрована –  $68,2 \pm 0,2$  °Т. Це може бути пов'язано з його високою початковою швидкістю росту та ефективним гетероферментативним метаболізмом.

З урахуванням кількості життєздатних клітин МКБ після 12 місяців зберігання різними способами для визначення активності кислотоутворення були використані культури МКБ, що зберігалися при низькотемпературному заморожуванні. Значення активної кислотності молока при культивуванні у ньому МКБ підвищилося і визначено у межах 5,7 (для штаму *L. bifermantans* МЛБ 53\_1) – 6,6 (для штаму *L. bifermantans* МЛБ 10\_2). Загалом рН молока, ферментованого МКБ, підвищилося на 0,3–0,9 одиниць в залежності від дослідженого штаму. Натомість, зменшилися показники титрованої кислотності згустку. В залежності від штаму МКБ, цей показник коливався від  $32,5 \pm 0,1$  °Т до  $52,4 \pm 0,2$  °Т. З літературних джерел відомо, що кислотоутворювальна активність у МКБ варіює у широких межах і залежить від багатьох причин, серед яких, окрім виду і навіть штаму, значний вплив мають умови і способи зберігання [10, 11].

Так, при дослідженні штамів МКБ, виділених із гідробіонтів Чорного моря, що зберігаються у колекції культур мікроорганізмів ОНУ імені І. І. Мечникова, встановлено, що основні біологічні властивості відповідають як таким, що притаманні представникам видів *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Loigolactobacillus bifermantans*, *Leuconostoc mesenteroides*.

При зберіганні у лабораторних умовах методами субкультивування, під шаром вазелінової олії і низькотемпературного заморожування протягом 12 місяців деякі властивості зазнавали зворотних змін. Через 9 місяців зберігання методами субкультивування і під шаром вазелінової олії спостерігали зміну морфології клітин паличкоподібних МКБ (штами видів *L. parabuchneri* і *L. bifermantans*) і дещо менше виражені тінкторіальні властивості. Через 12 місяців зберігання, окрім морфологічних і тінкторіальних варіацій відзначено уповільнення протікання біохімічних реакцій. Втім, декількаразові пересіви бактерій усіх штамів на свіжоприготоване живильне середовище MRS сприяли відновленню змінених властивостей.

Визначена кількість активних клітин на початку зберігання коливалася у межах  $34,2 \pm 6,9 \times 10^9$ – $96,3 \pm 5,1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> в залежності від штаму і є свідченням їх високої життєздатності. Протягом 12-ти місячного зберігання



зазначеними методами кількість життєздатних клітин бактерій усіх штамів поступово зменшувалася. З урахуванням і аналізом даних, отриманих при оцінці життєздатності МКБ протягом 12-ти місячного періоду зберігання в лабораторних умовах, найбільш ефективним є метод низькотемпературного заморожування.

Досить важливою характеристикою МКБ є активність кислотоутворення. При культивуванні у молоці МКБ на початку і через 12 місяців зберігання низькотемпературним заморожуванням показало коливання активної кислотності від 5,4–6,0 до 5,9–6,6; титрованої кислотності від 42,6–68,2 °Т до 32,5–52,4 °Т, в залежності від штаму. Найбільш активними кислотоутворювачами були штами виду *L. mesenteroides*.

Таким чином, проведені дослідження показали, що найбільш ефективним методом зберігання в лабораторних умовах МКБ, виділених з гідробіонтів, є метод низькотемпературного заморожування, який забезпечує збереження життєздатності, біологічних властивостей і кислотоутворювальної активності.

Перспективи використання досліджених штамів молочнокислих бактерій морського походження є надзвичайно значними та після проведення низки досліджень (зокрема, стійкості до чинників травного тракту, токсикологічної оцінки на лабораторних тваринах тощо) будуть зосереджені у сферах аквакультури (пробіотики для гідробіонтів), харчової промисловості (біоконсерванти, стартерні культури) та медицини (антимікробні агенти, імуномодулятори).

### Висновки

1. Кількість життєздатних клітин молочнокислих бактерій усіх досліджених штамів коливалася від  $34,2 \pm 6,9 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. parabuchneri* МЛБ 39\_1a) до  $96,3 \pm 5,1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (*L. bifermentans* МЛБ 68\_1a) з тенденцією до поступового зменшення цього показника протягом 12-місячного періоду зберігання різними методами.

2. Метод низькотемпературного заморожування забезпечує збереження великої кількості життєздатних клітин (не менше, ніж  $10^7$  КУО/см<sup>3</sup>) МКБ усіх штамів протягом 12 місяців.

3. Досліджені біологічні властивості на початку зберігання характеризували штами МКБ як представників видів *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Loigolactobacillus bifermentans*, *Leuconostoc mesenteroides*. Через 9–12 місяців зберігання відбувалися зворотні зміни морфологічних і тінкторіальних властивостей і подовжувався термін культивування до 48 год.

4. На початку зберігання значення активної і титрованої кислотності молока, ферментованого дослідженими МКБ, становило, відповідно, 5,4–6,0 і  $42,6 \pm 0,1$ – $68,2 \pm 0,2$  °Т, в залежності від штаму. Через 12 місяців зберігання методом низькотемпературного заморожування активність кислотоутворення бактеріями усіх штамів знизилась.



**G. V. Yamborko, I. V. Strashnova, S. I. Rakytska**

Odesa I. I. Mechnikov National University,  
2 Zmiiienka Vsevoloda St, Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: jamborkoann@ukr.net

## EFFECTIVENESS OF STORAGE OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM HYDROBIONTS OF THE BLACK SEA BY VARIOUS METHODS

### Summary

The wide industrial use of lactic acid bacteria (LAB) makes the choice of optimal long-term storage methods crucial for maintaining their viability, taxonomically important traits, and biotechnological properties. **Aim.** To evaluate the effectiveness of different storage methods for LAB strains isolated from Black Sea hydrobionts. **Materials and methods.** Fourteen LAB strains isolated from sponges *Haliclona* sp. and mussels *Mytilus galloprovincialis* (7 *Lentilactobacillus parabuchneri*, 5 *Loigolactobacillus bif fermentans*, 2 *Leuconostoc mesenteroides*) were stored using three approaches: periodic subculturing on agar medium, storage under a layer of vaseline oil, and low-temperature freezing in MRS broth with 30% glycerol. Viability (CFU/cm<sup>3</sup>) and biological properties were assessed at the beginning of storage and after 3, 6, 9, and 12 months. **Results.** At the beginning of storage, all strains demonstrated high viability, ranging from  $34.2 \times 10^9$  to  $96.3 \times 10^9$  CFU/cm<sup>3</sup>, depending on the strain. During 12-month storage by all methods, the number of viable cells gradually decreased. Low-temperature freezing proved to be the most effective method, ensuring the preservation of at least  $10^7$  CFU/cm<sup>3</sup> for all strains after 12 months. Strains of the three species retained key biological properties, although reversible changes in cell morphology, Gram-staining intensity and prolonged cultivation time (up to 48 h) were observed after 9–12 months, especially with subculturing and storage under oil. The acid-forming activity in milk fermentation ranged initially from pH 5.4–6.0 and 42.6–68.2 °T and decreased to pH 5.7–6.6 and 32.5–52.4 °T after 12 months of low-temperature storage. **Conclusions.** Low-temperature freezing is the most suitable method for long-term laboratory storage of marine LAB strains, providing good preservation of viability, biological properties, and acid-forming activity.

*Keywords:* storage methods, lactic acid bacteria, marine strains, biological properties, acid-forming activity.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Н.Ю., Страшнова І.В., Басюл О.В., Ковтун І.О., Іваниця В.О. Стійкість до антибіотиків молочнокислих коків, ізольованих з чорноморських водоростей і мідій // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 2(49). – С. 57–71. [http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2\(49\).212265](http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2(49).212265)
2. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології. – Київ: «Либідь», 2001. – 156 с.
3. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія: Посібник. – Тернопіль: «Укрмедкнига», 2004. – 440 с.
4. Перетятко О.Г., Ягнюк Ю.А., Пахомов О.В., Скляр Н.І., Крестецька С.Л. Вивчення впливу кріоконсервування на збереження життєз-



- датності мікроорганізмів роду *Escherichia* і *Staphylococcus* // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2019. – Вип. 4. – С. 36–41. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3572511>
5. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.
  6. Страшнова І.В., Ковтун І.О., Коротаєва Н.В. Характеристика молочнокислих бактерій губок Чорного моря // *Мікробіологія та біотехнологія*. – 2020. – № 1(48). – С. 79–94. [http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1\(48\).201567](http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1(48).201567)
  7. Цісарик О.Й., Сливка І.М., Мусій Л.Я., Кушнір І.І. Підбір молочнокислих бактерій, ізольованих з природних еконіш, для виготовлення кисловершкового масла геродієтичного призначення // *Науковий вісник ЛНУ-ВМБ імені С.З. Гжицького*. – 2018. – Т. 20(85). – С. 35–40. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8507>
  8. Шинкарук М.В., Балук О.О. Перспективні стартові культури для крафтових ковбасних виробів // *Таврійський науковий вісник*. – 2021. – № 5. – С. 38–48. <https://doi.org/10.32851/tnv-tech.2021.5.6>
  9. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics // *AIMS Microbiology*. – 2018. – Vol. 4. – P. 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
  10. Junior W.L., Ferrari I.S., Souza J.V., Barbosa A.L., Costa M.M. Principal criteria for selection of lactic acid bacteria for potential use as probiotics in foods // *Afr J Microbiol Res*. – 2015. – Vol. 9. – P. 671–686. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7226>
  11. Kandil S., Soda M.E. Influence of freezing and freeze-drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains // *Advances in Microbiology*. – 2015. – Vol. 5(6). – P. 371–382. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.56039>
  12. Mahajan P., Sufiyan M., Anwer Z. Marine drugs // *International Journal of Creative Research Thoughts*. – 2022. – V. 10(10). – P. 18–40. URL: [www.ijert](http://www.ijert)
  13. Mendoza G.M., Pasteris S.E., Otero M.C., Nader-Macias M.E.F. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from raniculture subjected to freeze-drying and storage // *J Appl Microbiol*. – 2014. – Vol. 116(1). – P. 157–166. <https://doi.org/10.1111/jam.12359>
  14. Musij L., Tsisaryk O., Slyvka I., Mykhaylytska O., Gutyj B. Study of keeping probiotic properties of cultured butter in storage // *Food Science and Technology*. – 2017. – Vol. 2(27). – P. 27–33. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2017.00318>
  15. Naghavi N.S., Rezaeizadeh G., Sarami F., Khayan-Nekooii M.S., Khosravi-Darani K. A comparison between different methods for the preservation of lactic acid bacteria for usage as a starter culture // *Journal of Microbial Biology*. – 2023. – Vol. 11(44). – P. 77–94. <https://doi.org/10.22108/bjm.2022.133007.1459>
  16. Pasalina P., Amran V., Devita H. The effect of storage time on colonization of lactic acid bacteria in breast milk // *Proceedings of 1st International*



- Conference on Health Sciences and Biotechnology (ICHB 2021). – 2022. – Vol. 47. – P. 127–129. <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.220303.026>
17. Senz M., van Lengerich B., Bader J., Stahl U. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – Vol. 192. – P. 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.015>
  18. Widhyasih R.M., Kristianto J., Lubis L.R., Mirawati M., Hodikoh A. Effect of addition of jelly and storage time on the number of lactic acid bacteria in yoghurt processed products // Open Access Maced J Med Sci. – 2021. – Vol. 9(A). – P. 1302–1305. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.7916>
  19. Zapaśnik A., Sokółowska B., Bryła M. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety // Foods. – 2022. – Vol. 11(9). – P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>

## REFERENCES

1. Vasylieva NYu, Strashnova IV, Basyul OV, Kovtun IO, Ivanytsia VO. Antibiotic resistance of lactic acid cocci isolated from Black Sea algae and mussels. [Stiykist' do antybiotykyv molochnokyslykh kokiv, izol'ovanykh z chornomors'kykh vodorostey i midiy]. *Microbiology and biotechnology*. 2020; 2(49): 57–71. [in Ukrainian]. [http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2\(49\).212265](http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.2(49).212265)
2. Vekirchuk KM. Workshop on microbiology [Praktykum z mikrobiolohiyi]. Kyiv «Lybid'», 2001; 156 s. [in Ukrainian].
3. Klimnyuk SI, Sytnyk IO, Tvorko MS, Shirobokov VP. Practical microbiology: Handbook [Praktychna mikrobiolohiya: Posibnyk]. Ternopil «Ukrmedknyga», 2004; 440 s. [in Ukrainian].
4. Peretyatko OG, Yagniuk YA, Pakhomov OV, Sklyar NI, Kresetska SL. Study of the effect of cryopreservation on the preservation of the viability of microorganisms of the genera *Escherichia* and *Staphylococcus* [Vyvchennya vplyvu kriokonservuvannya na zberezhennya zhyttyezdatnosti mikroorhanizmiv rodu *Escherichia* i *Staphylococcus*]. *Annals of Mechnikov Institute*. 2019; 4: 36–41. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3572511>
5. Solomon AM, Kazmiruk NM, Tuzova SD. Microbiology of food production: a study guide for students of the "Food Technologies" field of study [Mikrobiolohiya kharchovykh vyrobnytstv: navchal'nyy posibnyk dlya studentiv napryamu pidhotovky «Kharchovi tekhnolohiyi»]. Vinnytsia RNVV VNAU, 2020; 312 s. [in Ukrainian].
6. Strashnova IV, Kovtun IO, Korotayeva NV. Characteristics of lactic acid bacteria of Black Sea sponges [Kharakterystyka molochnokyslykh bakteriy hubok Chornoho morya]. *Microbiology and biotechnology*. 2020; 1(48): 79–94. [in Ukrainian]. [http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1\(48\).201567](http://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1(48).201567)
7. Tsisaryk OY, Slyvka IM, Musii LYa, Kushnir II. Selection of lactic acid bacteria isolated from natural ekonishes for the production of sour cream oil for herodietic purpose [Pidbir molochnokyslykh bakteriy, izol'ovanykh z pryrodnykh ekonish, dlya vyhotovlennya kyslovershkovoho masla



- herodiyetychnoho pryznachennya]. *S.Z. Gzhitskyi Scientific Bulletin of the LNUVMB*. 2018; 20(85): 35–40. [in Ukrainian].  
<https://doi.org/10.15421/nvlvet8507>
8. Shinkaruk MV, Baluk OO. Promising starter cultures for craft sausage products [Perspektyvni startovi kul'tury dlya kraftovykh kovbasnykh vyrobiv]. *Taurian Scientific Herald*. 2021; 5: 38–48. [in Ukrainian].  
<https://doi.org/10.32851/tnv-tech.2021.5.6>
  9. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*. 2018; 4: 665–684.  
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
  10. Junior WL, Ferrari IS, Souza JV, Barbosa AL, Costa MM. Principal criteria for selection of lactic acid bacteria for potential use as probiotics in foods. *Afr J Microbiol Res*. 2015; 9: 671–686. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7226>
  11. Kandil S, Soda ME. Influence of freezing and freeze-drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. *Advances in Microbiology*. 2015; 5(6): 371–382.  
<https://doi.org/10.4236/aim.2015.56039>
  12. Mahajan P, Sufiyan M, Anwer Z. Marine drugs. *International Journal of Creative Research Thoughts*. 2022; 10(10): 18–40. URL: [www.ijert.com](http://www.ijert.com)
  13. Mendoza GM, Pasteris SE, Otero MC, Nader-Macias MEF. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from raniculture subjected to freeze-drying and storage. *J Appl Microbiol*. 2014; 116(1): 157–166.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12359>
  14. Musij L, Tsisaryk O, Slyvka I, Mykhaylytska O, Gutyj B. Study of keeping probiotic properties of cultured butter in storage. *Food Science and Technology*. 2017; 2(27): 27–33. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2017.00318>
  15. Naghavi NS, Rezaeizadeh G, Sarami F, Khayan-Nekooii MS, Khosravi-Darani K. A comparison between different methods for the preservation of lactic acid bacteria for usage as a starter culture. *Journal of Microbial Biology*. 2023; 11(44): 77–94. <https://doi.org/10.22108/bjm.2022.133007.1459>
  16. Pasalina P, Amran V, Devita H. The effect of storage time on colonization of lactic acid bacteria in breast milk. *Proceedings of 1st International Conference on Health Sciences and Biotechnology (ICHB 2021)*. 2022; 47: 127–129. <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.220303.026>
  17. Senz M, van Lengerich B, Bader J, Stahl U. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2015; 192: 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.015>
  18. Widhyasih RM, Kristianto J, Lubis LR, Mirawati M, Hodikoh A. Effect of addition of jelly and storage time on the number of lactic acid bacteria in yoghurt processed products. *Open Access Maced J Med Sci*. 2021; 9(A): 1302–1305. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.7916>
  19. Zapašnik A, Sokołowska B, Bryła M. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*. 2022; 11(9): 1–17.  
<https://doi.org/10.3390/foods11091283>

Стаття надійшла до редакції 28.11.2025 р.

