

І.В. Страшнова, Г.В. Ямборко, Н.Ю. Васильєва

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: fabiyanska@ukr.net

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ ЗА СУМІСНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Мета. Дослідити антагоністичні властивості поліштамових композицій і консорціумів, створених на основі пробіотичних штамів бактерій роду *Lactobacillus*. **Методи.** Біосумісність досліджували при сумісному культивуванні штамів лактобацил на цільному живильному середовищі MRS. Для створення композицій використовували окремо вирожені добові бульйонні культури у певних співвідношеннях, для створення консорціумів – штами лактобацил у відповідних співвідношеннях культивували разом у MRS бульйоні протягом доби. Антагоністичну активність створених комбінацій щодо 10 тест-культур визначали лунково-дифузійним методом. **Результати.** За результатами дослідження біосумісності були відібрані штами *Lactobacillus* spp. 175, M2 і M3, на основі яких створено 7 композицій та 7 консорціумів з певними співвідношеннями бульйонних культур цих штамів. Лактобацили у складі композицій децю краще проявляють антимікробні властивості, у порівнянні з консорціумами. Найкращу антагоністичну активність щодо усіх тест-штамів мікроорганізмів проявила композиція *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175 у співвідношенні 1 : 2 : 2. **Висновки.** Створені на основі пробіотичних штамів *Lactobacillus* spp. 175, M2 і M3 композиції і консорціуми є активними антагоністами про- та еукаріотичних тест-культур мікроорганізмів. Прояв активності залежить від способу поєднання штамів у комбінації, найкращий ефект досягається при вирощуванні кожного штаму окремо з подальшим змішуванням бульйонних культур. Найбільш антагоністично активною є композиція, створена на основі бульйонних культур *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175 у співвідношенні 1 : 2 : 2.

Ключові слова: антагоністична активність, лактобацили, біосумісність, композиції, консорціуми

Створення лікувально-профілактичних препаратів на основі пробіотичних штамів мікроорганізмів є одним із актуальних завдань сучасної біотехнології. Більшість препаратів-пробіотиків створені на основі біфідобактерій і лактобацил, оскільки ці бактерії є складовими нормальної мікробіоти травного тракту і відіграють ключову фізіологічну роль у функціонуванні мікроеко-



логічної системи здорових людей. Із урахуванням накопичених даних [7, 12, 14, 17] доцільним і перспективним вважається конструювання комплексних препаратів із декількох штамів різних видів пробіотичних мікроорганізмів. Це дозволяє розширити їх специфічну активність, сприяє збереженню стабільності функціональних властивостей і тривалому виживанню в мінливих умовах навколишнього середовища. Вимоги до мікроорганізмів, які використовуються для створення як полікомпонентних, так і монокомпонентних пробіотиків, однакові. Перш за все, вони повинні бути безпечними і, що досить важливо, проявляти антагоністичну активність щодо умовно-патогенних і патогенних бактерій.

Метою даної роботи було дослідити антагоністичні властивості поліштамових композицій і консорціумів, створених на основі пробіотичних штамів бактерій роду *Lactobacillus*.

Матеріали і методи

У роботі використано 5 штамів лактобацил (*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 та M3), які за результатами попередніх досліджень [1, 2, 9, 16] є найбільш перспективними для створення поліштамових пробіотичних препаратів. Штами були виділені із різних природних джерел Одеського регіону: *Lactobacillus* spp. O1 і B4 – із самоквасних овочів, *Lactobacillus* spp. M2 і M3 – із м'ясної сировини, *Lactobacillus* sp. 175 – із травного тракту дітей.

Біосумісність лактобацил досліджували методом сумісного культивування штамів на щільному живильному середовищі MRS (MRS agar, Merck KGaA, Німеччина). Для цього добуву культуру, що виросла у рідкому живильному середовищі MRS (MRS broth, Merck KGaA, Німеччина), стандартизували до концентрації 10^6 КУО/см³ і краплю діаметром приблизно 3 мм наносили на поверхню MRS агару. Після підсихання краплі, відступивши 1–2 мм від її краю, наносили таку ж краплю іншої досліджуваної культури, яка, розтікаючись, приблизно наполовину покривала першу краплю. Після підсихання другої краплі чашки з посівами інкубували при 37 °С. У цій нашарованій зоні культури розвиваються у взаємній присутності (сумісне культивування), конкуруючи одна з одною. Кожен дослід проводили в двох повторах для виключення впливу послідовності нанесення крапель культур на характер росту в зоні сумісного культивування. Контролем були краплі однієї і тієї ж культури, нашаровані одна на одну як описано вище.

Облік результатів проводили візуально через 24 год від початку інкубації. У разі затримки росту однієї з досліджуваних культур взаємини між ними розглядалися як антагоністичні, а самі культури відносили до категорії «біо-несумісних» (рис. 1.a, 1.b). При цьому, якщо одна з культур в зоні сумісного культивування «виходила наверх», пригнічуючи ріст іншої культури, незалежно від послідовності їх нанесення, такий варіант розцінювали як слабкий антагонізм (рис. 1.a). Наявність явної зони затримки росту однієї з культур по периферії плями іншої досліджуваної культури розцінювали як ознаку «сильного антагонізму» (рис. 1.b). Культури вважали біосумісними в разі виявлення повного «злиття» плям або посилення росту досліджуваних штамів в зоні сумісного культивування (рис. 1.c).



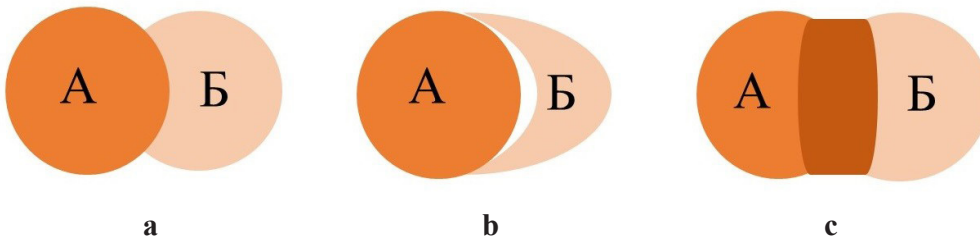


Рис. 1. Приклади сумісного культивування лактобацил

Примітка: а – штам А проявляє слабкий антагонізм щодо штаму Б; б – штам А проявляє сильний антагонізм щодо штаму Б; с – наявність або підсилення росту штамів у зоні спільного культивування

Fig. 1. Examples of lactobacilli co-cultivation

Note: a – strain A shows a weak antagonism against strain B; b – strain A shows a strong antagonism against strain B; c – the presence or enhancement of strains growth in the area of co-cultivation

Для створення композицій кожен штам лактобацил інкубували окремо у рідкому середовищі MRS при 37 °С, потім добові культури стандартизували до концентрацій 10^6 КУО/см³ і змішували у стерильних пробірках у певних співвідношеннях. Отримані суспензії одразу використовували у дослідженні антагоністичної активності.

Для створення консорціумів добові культури лактобацил змішували у відповідних співвідношеннях, вирощували у середовищі MRS бульйоні протягом 24 год при 37 °С, стандартизували до концентрацій 10^6 КУО/см³ і також використовували для визначення антагонізму.

Антагоністичну активність створених варіантів (комбінацій) визначали щодо 10 тест-культур: *Escherichia coli* ОНУ 90, *Proteus vulgaris* ОНУ 92, *Klebsiella pneumoniae* ОНУ 463, *Salmonella enteritidis* ОНУ 466, *Pseudomonas aeruginosa* ОНУ 211, *Bacillus subtilis* ОНУ 24, *Staphylococcus aureus* ОНУ 223, *Staphylococcus saprophyticus* ОНУ 537, *Candida albicans* ОНУ 415 і *Candida utilis* ОНУ 413. Штами індикаторних мікроорганізмів попередньо культивували у живильному бульйоні протягом 24 год при 37 °С (бактерії) і у рідкому середовищі Сабуро при 30 °С (дріжджоподібні гриби). Дослідження проводили за стандартною методикою лунково-дифузійним методом у товщі відповідного живильного середовища [3].

Облік результатів здійснювали через 24 год після інкубації при оптимальних для кожної групи мікроорганізмів температурах, вимірюючи діаметри зон відсутності росту індикаторних штамів навколо лунок з відповідними комбінаціями штамів лактобацил.

Дослідження щодо визначення антагоністичної активності проведено у трьох повторях.

Порівняльний аналіз результатів досліджень проводили, використовуючи t-критерій Ст'юдента. Достовірною вважалася різниця за показника $p \leq 0,05$ [4]. Статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel-2016.

Результати дослідження та їх обговорення

Успішний пошук серед молочнокислих бактерій штамів з антагоністичними властивостями і створення на їх основі вдалих комбінацій є передумовою розробки біотехнологій пробіотичних препаратів, які позитивно впливають на організм людини.

Скринінг лактобацил, ізольованих із різних екологічних джерел в Одеському регіоні, за антагоністичними властивостями, активністю кислотоутворення, стійкістю до рН, NaCl, жовчі, трипсину, пепсину та фенолу дозволив відібрати 5 штамів (*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 і M3) [1, 2, 9, 16] для створення поліштамових композицій і консорціумів.

На жаль, багато пробіотиків полікомпонентного складу являють собою механічну суміш штамів і не мають задекларованої ефективності. Однією з основних характеристик штамів, які пропонуються використовувати для конструювання бактеріальних препаратів, є біосумісність. Тобто штами не повинні пригнічувати один одного, оскільки в протилежному випадку всі корисні властивості одного зі штамів нівелюються або значно зменшуються.

При дослідженні біосумісності визначали тип взаємодій між пробіотичними штамами лактобацилами, оснований на аналізі характеру росту культур у зоні нашарування тобто у зоні сумісного культивування.

Результати дослідження біосумісності штамів молочнокислих бактерій, наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Міжштамові взаємодії лактобацил при сумісному культивуванні

Table 1

Interstrain interactions of lactobacilli in co-cultivation

Штам А	Штам Б				
	<i>Lactobacillus</i> sp. O1	<i>Lactobacillus</i> sp. B4	<i>Lactobacillus</i> sp. M2	<i>Lactobacillus</i> sp. M3	<i>Lactobacillus</i> sp. 175
<i>Lactobacillus</i> sp. O1		3	3	2	3
<i>Lactobacillus</i> sp. B4	3		1	3	3
<i>Lactobacillus</i> sp. M2	3	3		3	3
<i>Lactobacillus</i> sp. M3	3	3	3		3 Підсилення росту
<i>Lactobacillus</i> sp. 175	3	3	3	3	

Примітка: 1 – *Lactobacillus* sp. B4 – слабкий антагоніст *Lactobacillus* sp. M2; 2 – *Lactobacillus* sp. O1 – сильний антагоніст *Lactobacillus* sp. M3; 3 – наявність росту штамів у зоні спільного культивування.

Note: 1 – *Lactobacillus* sp. B4 is a weak antagonist of *Lactobacillus* sp. M2; 2 – *Lactobacillus* sp. O1 is a strong antagonist of *Lactobacillus* sp. M3; 3 – the presence of strains growth in the area of co-cultivation.



Відсутність зон затримки росту досліджених штамів лактобацил за їх спільного культивування на щільному середовищі MRS вказує на їх біосумісність. Згідно отриманих даних, не доцільно поєднувати в комбінаціях штами *Lactobacillus* sp. O1 і *Lactobacillus* sp. M3 (*Lactobacillus* sp. O1 виявився сильним антагоністом до штаму *Lactobacillus* sp. M3) і штаму *Lactobacillus* sp. B4 зі штамом *Lactobacillus* sp. M2, оскільки в цій парі антагоністом є *Lactobacillus* sp. B4. В усіх інших варіантах дослідіу штами були біосумісними. Варто зазначити, що штаму *Lactobacillus* sp. M3 підсилював ріст штаму *Lactobacillus* sp. 175, що є додатковою позитивною ознакою їх відбору для подальших досліджень.

В аналогічних дослідженнях інших авторів показано як механізми, що засновані на харчових взаємодіях, можуть бути використані для створення ефективних комбінацій молочнокислих бактерій [6, 10] і доведено можливість спільного культивування окремих штамів молочнокислих бактерій у вдало підібраних парах, а також отримання багатокомпонентних пробіотичних препаратів [15].

Відповідно до отриманих результатів, а також з урахуванням критеріїв, які висуваються до пробіотичних культур, для створення комбінацій було відібрано три найбільш перспективні штами – *Lactobacillus* spp. 175, M2 та M3.

Усього було створено 7 композицій та 7 консорціумів з різними співвідношеннями об'ємів бульйонних культур використаних штамів (табл. 2).

Наприклад, для створення варіанту А композиційного складу було використано добові бульйонні культури штамів *Lactobacillus* sp. M2, *Lactobacillus* sp. M3 і *Lactobacillus* sp. 175 у співвідношенні 1 : 1 : 1; варіанту В співвідношення культуральних рідин вказаних штамів – 2 : 1 : 1.

Таблиця 2

Варіанти комбінацій на основі досліджених штамів лактобацил

Table 2

Combination's variants of s based on the studied strains of lactobacilli

Варіант		Співвідношення бульйонних культур штамів <i>Lactobacillus</i> sp. M2 + <i>Lactobacillus</i> sp. M3 + <i>Lactobacillus</i> sp. 175
КОМПОЗИЦІЇ	A	1 : 1 : 1
	B	2 : 1 : 1
	C	1 : 2 : 1
	D	1 : 1 : 2
	E	2 : 2 : 1
	F	1 : 2 : 2
	G	2 : 1 : 2
КОНСОРЦІУМИ	H	1 : 1 : 1
	I	2 : 1 : 1
	J	1 : 2 : 1
	K	1 : 1 : 2
	L	2 : 2 : 1
	M	1 : 2 : 2
	N	2 : 1 : 2



У свою чергу, при створенні консорціумів (варіанти Н – N) попередньо змішували добові бульйонні культури відповідних штамів у певних співвідношеннях (табл. 2), а потім вирощували за оптимальних умов.

Останнім часом з'являється все більше публікацій [6–8, 11], що свідчать про потенційні переваги застосування поліштамових (мультиштамових) пробіотичних препаратів порівняно з моноштамовими.

Вважається, що поліштамові пробіотики краще пригнічують патогенні мікроорганізми [7], досить часто спостерігається ефект синергізму, коли бактерії доповнюють дію одна одної [13] і проявляють більш різноманітні функціональні можливості [11]. Однак при створенні поліштамових комбінацій для досягнення максимального ефекту потрібно враховувати не тільки біосумісність пробіотичних штамів, а й інші параметри, а саме, на якому етапі і яким чином поєднувати штами у комбінації, оскільки це може суттєво впливати на прояв пробіотичних властивостей, зокрема антагоністичної активності.

Тому наступним етапом роботи було дослідити антагоністичні властивості створених варіантів щодо тест-штамів мікроорганізмів, які зберігаються у Колекції культур мікроорганізмів ОНУ імені І.І. Мечникова. Необхідно підкреслити, що у варіанті досліду з композиціями кожен штам лактобацил інкубували окремо, в подальшому змішуючи добові суспензії. У цьому випадку кожен штам мав змогу повною мірою синтезувати пригнічувальні речовини за умов традиційного культивування (у MRS-бульйоні, при 37 °C, 24 год). У випадку з консорціумами штами одразу інкубували разом. Це давало можливість оцінити залежність прояву антагоністичної активності від способу поєднання лактобацил у комбінації.

Результати визначення антагонізму створених комбінацій лактобацил наведено у табл. 3.

Усі створені на основі штамів *Lactobacillus* spp. 175, M2 та M3 композиції та консорціуми суттєво пригнічували ріст усіх тест-штамів. Зауважимо, що згідно результатів наших попередніх досліджень, антагоністична активність як композицій, так і консорціумів загалом була вищою у порівнянні з моноштамовими суспензіями вказаних штамів [9]. У переважній більшості випадків зони відсутності росту індикаторів перевищували 20,0 мм.

Найчутливішим до продуктів метаболізму лактобацил у складі створених комбінацій виявився штам *S. saprophyticus* ОНУ 537, розміри зон відсутності росту якого досить часто перевищували 30,0 мм. Найстійкішим – *K. pneumoniae* ОНУ 463, при цьому штами лактобацил у складі композицій краще пригнічували ріст цього індикатора, ніж ці самі штами у складі консорціумів. Загалом варто відзначити, що варіанти композиційного складу незначною мірою краще пригнічували ріст індикаторних мікроорганізмів, порівняно з консорціумами (коли штами лактобацил культивували разом). Можливо, деякі пригнічувальні речовини при сумісному культивуванні штамів інактивують одні інших.



Антагоністична активність створених комбінацій лактобацил

Table 3

Antagonistic activity of created lactobacilli combinations

Варіант	Діаметр зони відсутності росту тест-штаму, мм										
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. Coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. utilis</i>	
A	23,67±1,31	22,67±0,65	30,67±0,65	26,67±0,65	22,67±1,31	22,00±1,13	20,67±0,65	20,67±1,31	20,67±0,65	21,33±0,65	
B	22,00±1,13	24,00±1,13	30,00±1,13	25,33±0,65	21,33±0,65	22,33±0,65	23,67±0,65	20,67±0,65	20,00±1,13	20,33±0,65	
C	22,67±1,31	22,67±0,65	32,67±0,65	25,00±1,13	20,67±0,65	21,00±1,13	21,67±0,65	23,33±0,65	20,33±1,31	21,67±1,31	
D	21,00±1,13	22,00±1,13	28,67±0,65	22,00±1,13	20,33±0,65	19,33±0,65	23,33±0,65	22,33±1,73	21,67±0,65	21,67±0,65	
E	23,67±1,73	22,33±1,31	24,00±1,13	22,67±0,65	21,00±1,13	19,67±0,65	22,00±1,13	20,67±1,73	20,33±0,65	23,67±0,65	
F	24,67±0,65	23,33±0,65	33,33±0,65	26,67±0,65	25,00±1,13	24,33±0,65	23,67±0,65	24,00±1,13	21,33±0,65	23,33±0,65	
G	21,33±0,65	21,33±1,31	29,00±1,13	24,67±1,31	21,67±0,65	21,67±1,73	23,33±0,65	21,33±0,65	20,67±1,73	20,67±1,73	
H	21,33±1,31	19,67±0,65	30,33±0,65	21,33±0,65	22,33±1,31	21,33±0,65	19,33±0,65	19,67±0,65	20,67±0,65	18,33±0,65	
I	22,67±0,65	20,67±0,65	28,67±0,65	20,67±1,31	20,00±1,13	22,67±0,65	20,33±0,65	18,33±0,65	18,67±0,65	19,67±0,65	
J	20,67±0,65	21,33±1,31	27,33±0,65	21,67±1,31	21,67±0,65	19,67±0,65	18,33±0,65	20,33±1,31	19,00±1,13	18,33±0,65	
K	22,00±1,13	19,67±1,31	27,00±1,13	20,00±1,13	22,00±1,13	21,33±0,65	18,00±1,13	20,67±1,31	20,67±0,65	20,33±1,31	
L	19,00±1,13	22,67±1,31	26,33±0,65	22,33±0,65	21,33±0,65	22,33±1,31	17,33±0,65	19,00±1,13	19,67±0,65	20,33±0,65	
M	21,33±1,73	20,00±1,13	29,00±1,13	23,00±1,13	23,00±1,13	21,67±1,73	19,67±1,73	20,00±1,13	20,33±1,31	21,00±1,13	
N	18,67±0,65	20,67±1,31	28,67±0,65	22,67±0,65	21,00±1,13	18,33±0,65	19,33±1,73	20,33±0,65	18,33±0,65	21,00±1,13	



У результатах багатьох дослідників також повідомляється про кращий антагоністичний ефект мультиштамових пробіотиків. Так, зокрема у роботі Fijan S. et al. (2018) показано, що пробіотичні препарати на основі штамів лактобацил і біфідобактерій (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 і *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12) є кращими антагоністами ентеропаатогенних кишкових паличок, ніж моноштамові пробіотики на основі цих самих штамів, при чому прояв властивостей залежить від способу поєднання штамів у препараті [8]. У дослідженнях Ambalam P. et al. (2015) оцінено антимікробну активність штамів *Lactobacillus paracasei* F8 і *Lactobacillus plantarum* F44 в монота ко-культурах з *Bifidobacterium breve* 46 і *Bifidobacterium animalis sub sp. lactis* щодо клінічних штамів *Clostridium difficile* і гіпервірулентного штаму *Clostridium difficile* NAPI/027. Досліджені штами виявилися сумісними одні з іншими, продемонстрували інтенсивний ріст в ко-культури і значно пригнічували ріст як клінічних штамів *C. difficile*, так і супервірулентного завдяки продукції органічних кислот і термостабільних протеазочутливих протимікробних пептидів [5].

Досить детально описані типи взаємодій ко-культур чи консорціумів [10] і молекулярні механізми, за допомогою яких багатощтамові пробіотики проявляють свою дію, включають міжклітинні комунікації, взаємодію з тканинами господаря та модуляцію імунної системи [12].

У проведених дослідженнях найкращу антагоністичну активність проявила композиція *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175, що містила бульйонні культури у співвідношенні 1 : 2 : 2 (варіант F). Зони відсутності росту тест-штамів за сумісної дії метаболітів лактобацил варіювали від 21,33±0,65 мм (встановлено для штаму *C. albicans* ОНУ 415) до 33,33±0,65 мм (визначено для штаму *S. saprofiticus* ОНУ 537) (рис. 2). Також ця композиція суттєво пригнічувала ріст й інших тест-штамів, зокрема *S. aureus* ОНУ 223, *P. aeruginosa* ОНУ 211, *S. enteritidis* ОНУ 466 і *K. pneumoniae* ОНУ 463.

Консорціум такого ж складу (варіант М), так само як і моноштамові бульйонні культури, проявили меншу антагоністичну активність, порівняно з композицією у більшості випадків (рис. 2).

Як видно із наведених на рис. 2 даних, за дії антагоністично активних продуктів метаболізму лактобацил у складі композиції F зони відсутності росту майже усіх тест-штамів збільшилися.

Таким чином, на підставі дослідження антагоністичної активності та вивчення біосумісності було відібрано 3 пробіотичних штами молочнокислих бактерій: *Lactobacillus* sp. 175, *Lactobacillus* sp. M2 і *Lactobacillus* sp. M3, і створено 14 варіантів комбінацій. Аналіз антагоністичної активності створених композицій і консорціумів показав, що усі вони суттєво пригнічують ріст тест-штамів мікроорганізмів. Однак прояв активності залежить від способу створення комбінації, найкращий ефект досягається при вирощуванні кожного штаму окремо з подальшим поєднанням бульйонних культур.

Для подальших досліджень щодо удосконалення комплексних препаратів із декількох штамів різних видів пробіотичних мікроорганізмів



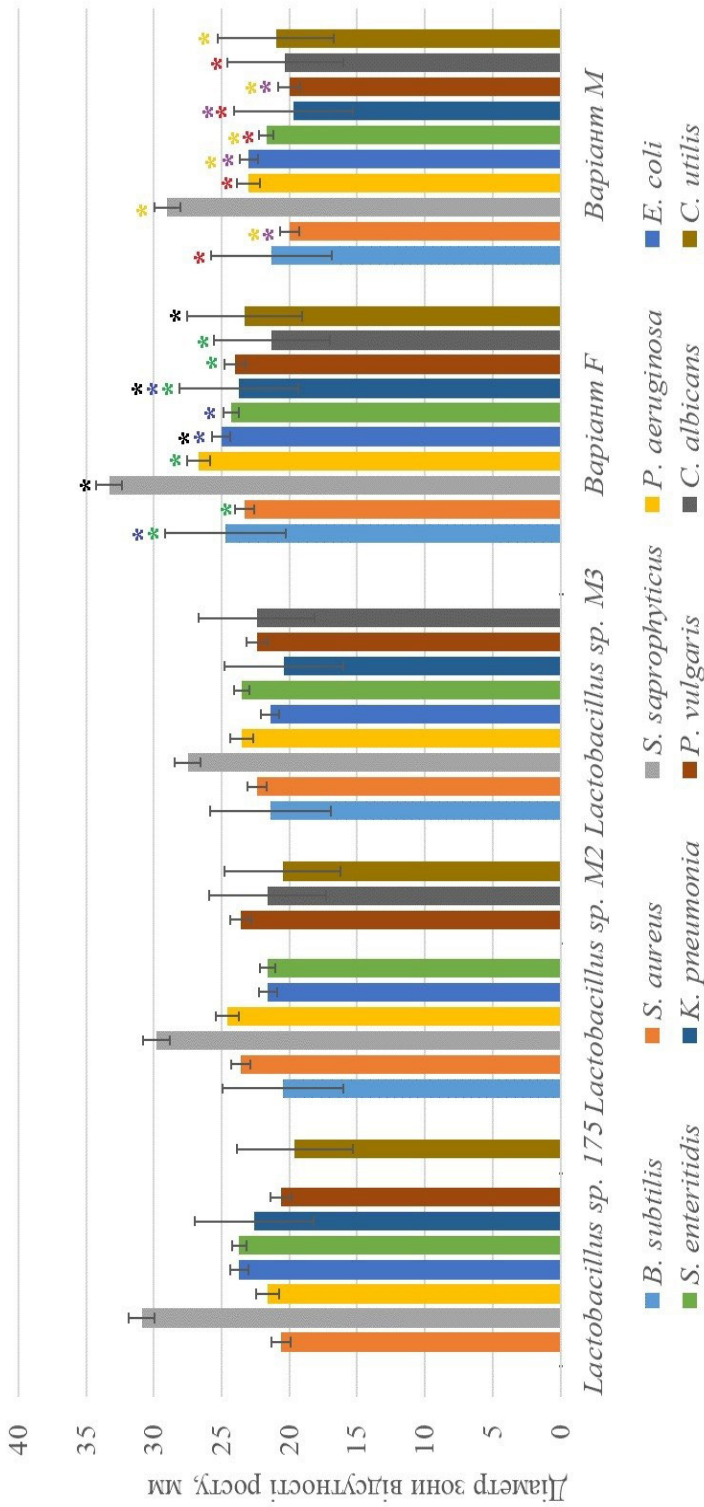


Рис. 2. Антагоністична активність лактобацил

Примітка: позначення достовірної різниці між дослідженими за критерієм Стьюдента

* *Lactobacillus* sp. 175 ~ Варіант F; * *Lactobacillus* sp. M2 ~ Варіант F; * *Lactobacillus* sp. M3 ~ Варіант F; * *Lactobacillus* sp. 175 ~ Варіант M; * *Lactobacillus* sp. M2 ~ Варіант M; * *Lactobacillus* sp. M3 ~ Варіант M

Fig. 2. Antagonistic activity of lactobacilli

Note: indicating a significant difference between the studied by Student's criterion

* *Lactobacillus* sp. 175 ~ Variant F; * *Lactobacillus* sp. M2 ~ Variant F; * *Lactobacillus* sp. M3 ~ Variant F; * *Lactobacillus* sp. 175 ~ Variant M; * *Lactobacillus* sp. M2 ~ Variant M; * *Lactobacillus* sp. M3 ~ Variant M

було обрано композицію бульйонних культур штамів *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175 у співвідношенні 1 : 2 : 2.

I.V. Strashnova, G.V. Yamborko, N.Yu. Vasylieva
Odesa National I.I. Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: fabiyanska@ukr.net

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTOBACILLI PROBIOTIC STRAINS IN CO-CULTIVATION

Summary

Aim. To investigate the antagonistic properties of multistrain compositions and consortia created on the basis of probiotic strains of bacteria of the genus *Lactobacillus*. **Methods.** A biocompatibility was investigated by co-cultivation of lactobacilli strains on MRS-agar medium. To create the compositions used separately grown daily broth cultures in certain proportions, to create consortia - strains of lactobacilli in the appropriate proportions were cultivated together in MRS broth during 24 h. The antagonistic activity of the created combinations against 10 test cultures was determined by the well-diffusion method. **Results.** According to the results of biocompatibility studies, strains of *Lactobacillus* spp. 175, M2 and M3 were selected. These strains were basis for creation 7 compositions and 7 consortia with certain ratios of broth cultures of these strains. Lactobacilli in the compositions show slightly better antimicrobial properties compared to consortia. The composition of *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175 in a ratio of 1: 2: 2 showed the best antagonistic activity against all test strains of microorganisms. **Conclusions.** Created on the basis of probiotic strains of *Lactobacillus* spp. 175, M2 and M3 compositions and consortia are strong antagonists of different test cultures. Manifestation of activity depends on the method of combining strains in combination, the best effect is achieved by growing each strain separately with subsequent mixing of broth cultures. The most antagonistically active is a composition based on broth cultures of *Lactobacillus* sp. M2 + *Lactobacillus* sp. M3 + *Lactobacillus* sp. 175 in a ratio of 1: 2: 2.

Key words: antagonistic activity, lactobacilli, biocompatibility, compositions, consortia

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Страшнова І.В., Ямборко Г.В., Васильєва Н.Ю. Стійкість штамів лактобацил, виділених з різних джерел, до деяких агресивних чинників травного тракту // Мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 2 (46). – С. 38–50. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176)
2. Страшнова І., Ямборко Г., Васильєва Н. Вплив деяких чинників шлунково-кишкового тракту на життєздатність лактобацил, виділених з різних екологічних ніш // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2019. – Випуск 81. – С. 130–138. <https://doi.org/10.30970/vbi.2019.81.14>
3. Пат. 80934 Україна, МПК (2006) С12Q 1/02, С12Q 1/18, G01N 33/58 на винахід. Спосіб визначення індивідуальної чутливості умовно-патогенних мікроорганізмів до пробіотичного препарату / Лісяна Т.О., Лі-



- сяний М.І., Пономарьова І.Г.; заявл. 28.11.2006; опубл. 12.11.2007, Бюл. № 1. – 20 с.
4. Прилуцький Ю.І., Льченко О.В., Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Статистичні методи в біології: підручник. – К.: Наукова думка, 2017. – 216 с.
 5. Ambalam P., Kondepudi K.K., Balusupati P., Nilsson I., Wadstrom T., Ljungh A. Prebiotic preferences of human lactobacilli strains in co-culture with bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile* // Journal of Applied Microbiology. – 2015. – Vol. 119 (6). – P. 1672–1682. <https://doi.org/10.1111/jam.12953>
 6. Canon F., Nidelet T., Guédon E., Thierry A., Gagnaire V. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>
 7. Chapman C.M.C., Gibson G.R., Rowland I. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens // Anaerobe. – 2012. – Vol. 18 (1). – P. 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.004>
 8. Fijan S., Šulc D., Steyer A. Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli* // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2018. – Vol. 15 (7). – P. 1–15. doi:10.3390/ijerph15071539
 9. Ishchenko T.A., Gordievskaya T.V., Strashnova I.V., Yamborko G.V., Vasylieva N.Yu. Search for new biotechnologically valuable lactobacilli strains // Materials of International conference of young scientists “Modern problems of microbiology and biotechnology (18th - 21st June 2019, Odesa). – Odesa: «Odesa I.I. Mechnikov National University». – 2019. – P. 28–37.
 10. Kapoora R.V., Padmaperumaa G., Maneeina S., Vaidyanathan S. Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing // Critical Reviews in Biotechnology. – 2022. – Vol. 42, № 1. – P. 46–72. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1921691>
 11. Kobyliak N., Conte C., Cammarota G., Haley A.P., Styriak I., Gaspar L., Fusek J., Rodrigo L., Kruzliak P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view // Nutrition and Metabolism. – 2016. – Vol. 13. – P. 1–13. doi:10.1186/s12986-016-0067-0
 12. Kwoji I.D., Aiyegoro O.A., Okpeku M., Adeleke M.A. Multi-strain probiotics: synergy among isolates enhances biological activities // Biology. – 2021. – Vol. 10. – P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/biology10040322>
 13. MacPherson C., Audy J., Mathieu O., Tompkins T.A. Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells' Immune Response to a Double-Stranded RNA Ligand, Poly(I-C) // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – Vol. 80, № 5. – P. 1692–1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.03411-13>.
 14. McFarland L.V. Efficacy of single-strain probiotics versus multi-strain mixtures: systematic review of strain and disease specificity // Digestive Diseases and Sciences. – 2021. – Vol. 66. – P. 694–704. doi: 10.1007/s10620-020-06244-z



15. Mukhammadiev Rish S., Mukhammadieva A.S., Skvortsov E.V., Mukhammadiev Rin S., Glinushkin A.P., Valiullin L.R. Antagonistic properties and biocompatibility as important principles for development of effective and biosafety probiotic drugs // Economic and Phytosanitary Rationale for the Introduction of Feed Plants. OP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 663. – P. 1–8. doi:10.1088/1755-1315/663/1/012008
16. Strashnova I.V., Yamborko G.V., Vasyliieva N.Yu. Biological activity of lactobacilli from different ecological niches of the southern region of Ukraine // Мікробіологія і біотехнологія. – 2020. – № 1 (48). – С. 6–19. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1\(48\).200811](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1(48).200811)
17. Timmerman H.M., Koning C.J.M., Mulder L., Rombouts F.M., Beynen A.C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy // Int J Food Microbiol. – 2004. – Vol. 96 (3). – P. 219–233. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012

REFERENCES

1. Strashnova IV, Yamborko HV, Vasyliieva NIu. Resistance of lactobacilli strains isolated from different source to some aggressive factors of the digital tract. Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia. 2019; 2 (46): 38–50. (in Ukrainian). [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176)
2. Strashnova I, Yamborko H, Vasyliieva N. The influence of some factors of the digestive tract on the lactobacilli lives from different environmental niches. Visnyk Lvivskoho universytetu. Seriiia biolohichna. 2019; 81: 130–138. (in Ukrainian). <https://doi.org/10.30970/vbi.2019.81.14>
3. Pat. 80934 Ukraina, MPK (2006) C12Q 1/02, C12Q 1/18, G01N 33/58 na vynakhid. Method of determining the individual sensitivity of opportunistic pathogens to probiotic preparation. Lisiana TO, Lisiany MI, Ponomarova IH; zaiavl. 28.11.2006; opubl. 12.11.2007, Biul. 1: 20. (in Ukrainian)
4. Prylutskyi YuI, Ilchenko OV, Tsymbaliuk OV, Kosterin SO. Statistical methods in biology: a textbook. K.: Naukova dumka, 2017: 216. (in Ukrainian)
5. Ambalam P, Kondepudi KK, Balusupati P, Nilsson I, Wadstrom T, Ljungh A. Prebiotic preferences of human lactobacilli strains inco-culture with bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. Journal of Applied Microbiology. 2015; 119 (6): 1672–1682. <https://doi.org/10.1111/jam.12953>
6. Canon F, Nidelet T, Guédon E, Thierry A, Gagnaire V. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. Frontiers in Microbiology. 2020; 11: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>
7. Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. *In vitro* evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. Anaerobe. 2012; 18 (1): 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.004>
8. Fijan S, Šulc D, Steyer A. Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018; 15 (7): 1–15. doi:10.3390/ijerph15071539



9. Ishchenko TA, Gordievskaya TV, Strashnova IV, Yamborko GV, Vasylieva NYu. Search for new biotechnologically valuable lactobacilli strains. Materials of International conference of young scientists “Modern problems of microbiology and biotechnology (18th-21st June 2019, Odesa). Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University. 2019: 28–37.
10. Kapoorea RV, Padmaperumaa G, Maneeina S, Vaidyanathan S. Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2022; 42 (1): 46–72. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1921691>
11. Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, Haley AP, Styriak I, Gaspar L, Fusek J, Rodrigo L, Kruzliak P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition and Metabolism*. 2016; 13: 1–13. doi: 10.1186/s12986-016-0067-0
12. Kwoji ID, Aiyegoro OA, Okpeku M, Adeleke MA. Multi-strain probiotics: synergy among isolates enhances biological activities. *Biology*. 2021; 10: 1–20. <https://doi.org/10.3390/biology10040322>
13. MacPherson C, Audy J, Mathieu O, Tompkins TA. Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells’ Immune Response to a Double-Stranded RNA Ligand, Poly(I·C). *Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 80 (5): 1692–1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.03411-13>.
14. McFarland LV. Efficacy of single-strain probiotics versus multi-strain mixtures: systematic review of strain and disease specificity. *Digestive Diseases and Sciences*. 2021; 66: 694–704. doi: 10.1007/s10620-020-06244-z
15. Mukhammadiev Rish S, Mukhammadieva AS, Skvortsov EV, Mukhammadiev Rin S, Glinushkin AP, Valiullin LR. Antagonistic properties and biocompatibility as important principles for development of effective and biosafety probiotic drugs. *Economic and Phytosanitary Rationale for the Introduction of Feed Plants*. OP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2021; 663: 1–8. doi:10.1088/1755-1315/663/1/012008
16. Strashnova IV, Yamborko GV, Vasylieva NYu. Biological activity of lactobacilli from different ecological niches of the southern region of Ukraine. *Mikrobiologhiia i biotekhnologhiia*. 2020; № 1 (48): 6–19. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1\(48\).200811](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2020.1(48).200811)
17. Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol*. 2004; 96 (3): P. 219–233. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012

Стаття надійшла до редакції 01.04.2022 р.

