

УДК 579.871.1: 579.262: 577.18.04: 615.372

О.Ю. Ісаєнко*, О.В. Книш, М.М. Попов,
В.В. Мінухін, Є.М. Бабич, О.Г. Перетятко

Вплив біологічно активних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* після зберігання за низьких температур на здатність коринебактерій до утворення біоплівки

UDC 579.871.1: 579.262: 577.18.04: 615.372

О.Yu. Isayenko*, O.V. Knysh, M.M. Popov,
V.V. Minukhin, E.M. Babych, O.G. Peretyatko

Impact of Biologically Active Complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* After Storage Under Low Temperatures on Biofilm Forming Ability in Corynebacteria

Реферат: У роботі обґрунтовано температурні режими і терміни зберігання біологічно активних комплексів (структурних компонентів і метаболітів) *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*, які проявляють протимікробну активність та знижують формування біоплівки у патогенних збудників *Corynebacterium* spp. Показано збереженість біологічної активності комплексів після 6 місяців (термін спостереження) за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ та протягом 60 днів (термін спостереження) у гіпотермічних умовах при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$. Ступінь пригнічення утворення біоплівки патогенних коринебактерій залежав від чутливості штаму тест-культури *Corynebacterium* spp. до продуктів мікробного походження. Найменше формування біоплівки токсигенними штамами коринебактерій спостерігалось під впливом суміші метаболітів лактобактерій і сахароміцетів ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать про можливість застосування збережених біологічно активних речовин за температур 4 та -23°C у конструюванні комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, а також у технологічних процесах їх виробництва для профілактики персистенції збудників дифтерії.

Ключові слова: низькотемпературні режими зберігання, коринебактерії, біоплівки, біологічно активні комплекси, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, антибіоплівкова активність.

Abstract: This paper describes the temperature regimens and shelf life of biologically active complexes (structural components and metabolites) of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*, which have antimicrobial activity and reduce biofilm formation in pathogenic agents of *Corynebacterium* spp. Preservation of biological activity of complexes after 6-month storage (observation period) at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ and for 60 days (observation period) under hypothermia at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ has been demonstrated. The degree of inhibition of biofilm formation in pathogenic corynebacteria depended on sensitivity of the *Corynebacterium* spp. test-culture strain to products of microbial origin. A mixture of lactobacillus and saccharomycete metabolites displayed weak biofilm formation by toxicogenic strains of corynebacteria ($p < 0.05$). Our findings testified to a possible use of biologically active substances, stored at 4 and -23°C in designing the *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* complexes and in technological processes of their production to prevent the persistence of the diphtheria pathogens.

Key words: low temperature regimens of storage, corynebacteria, biofilm, biologically active complexes, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, anti-biofilm formation activity.

Епідеміологічна ситуація стосовно розповсюдження дифтерійної інфекції характеризується спорадичними спалахами та постійною циркуляцією збудника у вигляді здорового бактеріоносійства серед різних верст населення [9]. На сьогодні розроблено ефективні засоби лікування хворих, проте профілактичні препарати проти персистенції патогенних коринебактерій відсутні.

Ефективним напрямом профілактики бактеріальної персистенції є пригнічення здатності

Epidemiological situation in diphtheria spreading is characterized by sporadic outbreaks and a constant circulation of pathogen via healthy bacteria carrying among different population groups [14]. To date, the efficient treatments have been developed for patients with diphtheria, but there are no drugs preventing the persistence of pathogenic corynebacteria.

An efficient way to prevent bacterial persistence is inhibiting the microorganisms' ability of biofilm formation [3–6, 15, 16, 18, 20]. The biofilm for-

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Пушкінська 14–16, м. Харків, Україна 61057;
тел.:(+38057) 731-31-51, факс:(+38057) 731-34-69
електронна пошта: el_isaenko@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

14–16, Pushkinskaya str., Kharkiv, Ukraine 61057;
tel.:+380 57 731 3151, fax: +380 57 731 3469
e-mail: el_isaenko@ukr.net

Надійшла 01.10.2018

Прийнята до друку 20.04.2021

Received October, 01, 2018

Accepted 20, April, 2021

© 2021 O.Yu. Isayenko, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

мікроорганізмів до утворення біоплівки [12–18, 20]. Показано, що формування біоплівки стафілококами гальмують катіонний пептид варнерін і диметилсульфоксид [2].

Для пригнічення утворення біоплівок клітин *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis* перспективне застосування метаболітів лактобацил (*Lactobacillus plantarum* L3 і *Lactobacillus fermentum* 97) [10]. Вони призводять до загибелі збудників, викликаной ультраструктурними змінами в клітинах-мішенях і порушенням життєво важливих процесів (ділення клітин, синтез ДНК і пептидогліканового шару, відторгнення пептидогліканових глобул із поверхні клітинної стінки у зовнішнє середовище).

Нами розроблено зразки фільтратів, які проявляють протимікробну активність та знижують біоплівкові властивості патогенних коринебактерій [3–7]. Це біологічно активні комплекси (БАК) мікробних клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG або *Saccharomyces boulardii*: структурні компоненти, отримані після обробки клітин пробіотика ультразвуковим опроміненням, і метаболіти із середовищ культивування пробіотиків у структурних компонентах *L. rhamnosus* GG або *S. boulardii*. На сьогодні важливі такі питання, як вивчення умов і визначення термінів зберігання одержаних речовин для збереження біологічної активності зразків фільтратів [2–8, 10].

Для виробництва та застосування БАК пробіотичного походження в практичній медицині більш доцільно використовувати гіпотермію та помірно низькі температури, оскільки вони на відміну від криоконсервування мають ряд переваг (доступність, простота та економічність). Варто зазначити, що раніше дослідження з довгострокового зберігання речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, одержаних за авторською методикою, не проводили.

Мета роботи – обґрунтування режимів зберігання біологічно активних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii*, які проявляють протимікробну активність і знижують формування біоплівок у патогенних збудників *Corynebacterium* spp.

Матеріали та методи

У роботі використовували наступні штамподуценти:

- пробіотичний штам *L. rhamnosus* (LGG®) ATCC 53103, одержаний із симбіотика «PREEMA®» («Schonen», Швейцарія). Реєстрацію зазначеного препарату в Україні підтверджено висновком державної санітарно-епідеміологічної експертизи (№ 05.03.02-03/28238);

mation by staphylococci have been shown to inhibit the cationic peptide warnerin and dimethyl sulfoxide [7].

To suppress the biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* cells, the use of lactobacillus metabolites (*Lactobacillus plantarum* L3 and *Lactobacillus fermentum* 97) is promising [17]. Their use results in a death of pathogens, caused by ultrastructural changes in target cells and disruption of vital processes (cell division, synthesis of DNA and peptidoglycan layer, rejection of peptidoglycan globules from cell wall surface to external environment).

We have designed the samples of filtrates, that exhibit antimicrobial activity and reduce the biofilm properties of pathogenic corynebacteria [8–12]. These are the biologically active complexes (BACs) of microbial cells of *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Saccharomyces boulardii*: structural components obtained after treating probiotic cells with ultrasound irradiation, and metabolites from probiotic culture media in structural components of *L. rhamnosus* GG or *S. boulardii*. Today, of importance are studying the conditions and determining the shelf life for the obtained substances in order to preserve biological activity of filtrate samples [7–13, 17].

To produce and enroll the BACs of probiotic origin into practical medicine, it is more appropriate to use hypothermia and moderately low temperatures, because they have a number of advantages (availability, simplicity and cost-efficiency) in contrast to cryopreservation. Notably, that a long-term storage of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, obtained by the author's technique, has not been previously investigated.

The research aim was to substantiate the storage regimens of biologically active complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*, exhibiting antimicrobial activity and reducing the biofilm formation in *Corynebacterium* spp pathogenic agents.

Materials and methods

In this study, the following producing strains were used:

- probiotic strain of *L. rhamnosus* (LGG®) ATCC 53103, obtained from the symbiotic 'PREEMA®' (Schonen, Switzerland). This drug registration in Ukraine is confirmed by the hygiene certificate from the State Sanitary and Epidemiological Service (№ 05.03.02-03 / 28238);

- *S. boulardii* CNCM I-745 fungi, isolated from probiotic preparation 'BULARDI®' (Schonen). This drug registration in Ukraine is confirmed by the hygiene certificate from the State Sanitary



- гриби *S. boulardii* CNCM I-745, виділені з пробіотичного препарату «BULARDI®» («Scho-nen»). Реєстрацію зазначеного препарату в Україні підтверджено висновком державної санітарно-епідеміологічної експертизи (№ 05.03.02-03/58212).

Штами *L. rhamnosus* (LGG®) і *S. boulardii* вирощували на твердих живильних середовищах, які відповідали харчовим потребам мікроорганізмів: лактобакагар та середовище Сабуро [10]. Інкубацію зразків проводили протягом 18–20 годин за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, змивали з середовища культивування 0,9%-м розчином хлориду натрію та триразово відмивали мікробну масу від залишків середовища. Суспензії мікроорганізмів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* готували в 0,9%-му розчині хлориду натрію з застосуванням приладу «Densi-La-Meter» («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) і доводили до оптичної щільності 10,0 одиниць за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу. Мікробні клітини лактобактерій і сахароміцетів обробляли ультразвуком із використанням генератора «ГЗ–109» (Великолукський радіозавод, Росія). Оброблені зразки *L. rhamnosus* GG (L) і *S. boulardii* (S), які містять структурні компоненти, застосовували для вирощування культур лактобактерій і грибів, а також для проведення експериментів [6, 7].

Метаболіти *L. rhamnosus* (ML) та *S. boulardii* (MS) одержували з середовищ культивування продуцента в структурних компонентах пробіотиків. Мікробні суспензії лактобактерій або сахароміцетів із оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою McFarland вносили у власні структурні компоненти, культивували за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж 72 годин, центрифугували та фільтрували [7]. Для отримання оригінальних метаболітів мікробну суспензію сахароміцетів додавали до структурних компонентів лактобактерій (LS) або вносили суміші мікробних клітин лактобактерій і сахароміцетів до структурних компонентів *L. rhamnosus* GG (MLS) [6].

Оброблені ультразвуковим опроміненням зразки *L. rhamnosus* GG (L) і *S. boulardii* (S), які містять структурні компоненти, продукти метаболізму лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS, LS) і суміш (MLS), центрифугували при 1000g упродовж 30 хв, а супернатант пропускали через мембранний фільтр «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм). Подальші дослідження проводили на двох групах об'єктів: структурних компонентах (L, S) та метаболітах (ML, MLS, MS, LS) *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які є БАК пробіотичних мікроорганізмів [6, 7].

and Epidemiological Service (№ 05.03.02-03/58212).

The *L. rhamnosus* (LGG®) and *S. boulardii* strains were cultured on solid nutrient media that met the nutritional needs of microorganisms: Lactobacagar and Sabouraud medium [17]. Samples were incubated for 18–20 hrs at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, rinsed out of culture medium with 0.9% sodium chloride solution. Then the microbial mass was three-fold washed out of medium residues. Suspensions of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* microorganisms were prepared with 0.9% sodium chloride using Densi-La-Meter device (PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic) and brought to an optical density of 10.0 units by McFarland standards according to the manufacturer's instructions. Microbial cells of lactobacilli and saccharomycetes underwent ultrasonic treatment using G3–109 generator (Velikoluksky Radio Plant, Russia). The treated samples of *L. rhamnosus* GG (L) and *S. boulardii* (S), containing structural components, were used to culture lactobacilli and fungi, as well as for experiments [11, 12].

Metabolites of *L. rhamnosus* (ML) and *S. boulardii* (MS) were procured from the producer culture media in structural components of probiotics. Microbial suspensions of lactobacilli or saccharomycetes with an optical density of 10.0 units by McFarland standards were introduced into the own structural components, cultured at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 72 hrs, then centrifuged and filtered [12]. To obtain the original metabolites, a microbial suspension of saccharomycetes was supplemented to structural components of lactobacilli (LS) or the mixtures of lactobacilli and saccharomycetes microbial cells were added to structural components of *L. rhamnosus* GG (MLS) [11].

Samples of *L. rhamnosus* GG (L) and *S. boulardii* (S), treated with ultrasonic irradiation, containing structural components, metabolic products of lactobacilli (ML), saccharomycetes (MS, LS) and mixture (MLS), were centrifuged at 1,000g for 30 min, and the supernatant was filtered through membrane filter 'Vladipor' MFAS-B № 4 (0.2 μm pore diameter). Further studies were performed in two groups of objects: structural components (L, S) and metabolites (ML, MLS, MS, LS) of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, being the BACs of probiotic microorganisms [11, 12].

Biologically active complexes of structural components and metabolites (metabolic compounds) of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* were stored under different conditions:

- for 6 months in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$. The BACs samples were frozen by passive cooling



Біологічно активні комплекси структурних компонентів і метаболітів (метаболітних сполук) *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii* зберігали за різних умов:

- 6 місяців у замороженому стані за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$. Зразки БАК заморожували пасивним охолодженням у морозильній камері холодильника «Samsung RB29FSRND SA» («Samsung», Корея). Після цього зразки розморозували на водяній бані за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- 6 місяців у гіпотермічних умовах при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- 60 діб у гіпотермічних умовах при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Утворення біоплівки представниками *Corynebacterium* вивчали на токсигенних тест-штамах коринебактерій, які зберігаються в колекції мікроорганізмів лабораторії профілактики краплинних інфекцій (ДУ «ІМІ НАМН», Україна): *Corynebacterium ulcerans* tox+ 112; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ 108; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ 149 та *Corynebacterium diphtheriae belfanti* tox+ 147. Мікроорганізми вирощували на сприятливих для зазначених патогенних бактерій поживних середовищах (кров'яно-телуритовий агар) [11]. Культури синхронізували в гіпотермічних умовах за температури $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 30 хв [1]. Завись мікроорганізмів готували з добових культур токсигенних штамів коринебактерій. Оптичну густину суспензій бактерій за шкалою McFarland («Densi-La-Meter», «PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія). Концентрація мікробних клітин *Corynebacterium* у кінцевому розведенні складала $1,5 \times 10^7$ КУО / мл.

Мікробні біоплівки патогенних збудників отримували в стерильних полістиролових плоскодонних 96-лункових планшетах («Ексіскар-готрейд», Україна) за методом S. Stepanovic' та співавт. [19]. В усі дослідні та контрольні лунки вносили по 110 мкл тріптіказо-соевого бульйону та 1% глюкози. Поступово дослідні лунки доповнювали БАК, а контрольні – фізіологічним розчином натрію хлориду по 30 мкл. До дослідних та позитивних контрольних лунок (контроль культури) додавали по 10 мкл суспензії клітин *Corynebacterium*, у негативні контрольні лунки (контроль середовища) замість зависі тест-культур коринебактерій – фізіологічний розчин натрію хлориду. Герметично упаковані планшети інкубували в термостаті протягом 24 годин за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. На наступному етапі видаляли вміст лунок, тричі м'яко відмивали 0,1 М фосфатно-сольовим буфером (рН 7,2) із наступним висушуванням планшетів упродовж 60 хв при $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$. Зафіксовані біоплівки забарвлювали 1 %-м розчином кристалвіолету (150 мкл на лунку). Після ретельного промивання дистильованою

in a freezer of 'Samsung RB29FSRND SA' refrigerator (Samsung, South Korea), followed by samples' thawing in a water bath at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- for 6 months under hypothermia at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- for 60 days under hypothermia at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$.

The biofilm formation by *Corynebacterium* representatives was studied in toxigenic corynebacteria test strains, stored in the collection of microorganisms of the Laboratory of the Airborne Infections Prevention (SI 'Mechnikov Institute for Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Ukraine): *Corynebacterium ulcerans* tox+ 112; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ 108; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ 149 and *Corynebacterium diphtheriae belfanti* tox+ 147. Microorganisms were cultured with nutrient media favorable for these pathogenic bacteria (blood-tellurite agar) [1]. Cultures were synchronized under hypothermia at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 30 min [2]. The microorganism suspension was prepared from daily cultures of toxigenic strains of corynebacteria. Optical density of bacterial suspensions was determined by the McFarland standards (Densi-La-Meter, PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic). The concentration of *Corynebacterium* microbial cells in the final dilution was 1.5×10^7 CFU / ml.

Microbial biofilms of pathogens were obtained in sterile polystyrene flat bottom 96-well plates (EximCargoTrade, Ukraine) by the method described by S. Stepanovic' et al. [19]. All the experimental and control wells were filled with 110 μl of trypticase-soy broth and 1% glucose. Experimental wells were gradually filled with BACs, and by 30 μl of saline were introduced into the control ones. The experimental and positive control wells (culture control) were supplemented with 10 μl of *Corynebacterium* cell suspension, and the saline was introduced into the negative control wells (medium control) instead of the suspension of corynebacterial test cultures. Hermetically sealed plates were incubated in a thermostat for 24 hrs at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. The next step included the removal of well content, three-fold washing-out with 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.2), followed by plate drying for 60 min at $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$. The fixed biofilms were stained with 1% crystal violet solution (150 μl per well). After thorough washing with distilled water, the wells were filled with 150 μl of 96° ethanol and kept at room temperature for 30 min. The optical density (OD) of the experimental and control samples was measured using the 'Lisa Scan™ EM' 8-channel microplate analyzer (Erba Mannheim, Czech Republic) at 630 nm wavelength. The presence or



водою у лунки вносили по 150 мкл 96° етанолу та витримували 30 хв за кімнатної температури. Оптичну густина дослідних і контрольних зразків вимірювали за допомогою 8-канального мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan™ EM» («Erba Mannheim», Чехія) при довжині хвилі 630 нм. За зміною оптичної щільності тест-культури в дослідній пробі порівняно з контрольним зразком визначали наявність або відсутність впливу досліджуваних БАК на утворення біоплівки патогеном. Розрахунок здатності досліджуваних речовин впливати на біоплівкоутворення збудників проводили за формулою [19]:

$$OD_{\text{БАК}} = ODc - ODv,$$

де ODc – середнє дослідного штаму, ODv – значення відсічки (відривне значення), яке розраховували наступним чином: $ODv = OD_{\text{нк}} + (3 \times SD_{\text{нк}})$, де ODнк – середнє негативного контролю, SDнк – стандартне відхилення негативного контролю.

Суть розрахунку полягає в усередненні отриманих результатів (середні значення OD визначено для всіх дослідних тест-штамів і негативних контролів), а також у встановленні граничного значення OD за допомогою трьох стандартних відхилень SD. Під час оцінки та порівняння результатів формування біоплівок тест-культур, розрахованих за вищенаведеною формулою, негативний контроль є вихідним для всіх розрахунків [19]. Усі випробування виконували тричі в трьох повторях.

Обробку одержаних результатів досліджень здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою програми «Excel 2010» («Microsoft», США). Розбіжності між показниками вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Після 6-місячного зберігання у замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ всі БАК *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* показали високу здатність пригнічувати утворення біоплівки тест-культурами токсигенних коринебактерій (рис. 1). Статистично значуще зниження формування біоплівки *C. ulcerans* tox+ 112 спостерігали під впливом зразків S в 5,8 та 18,7 разів після витримки з MS порівняно з контролем ($p < 0,05$). Внаслідок впливу інших БАК (L, ML, MSL, LS) на *C. ulcerans* tox+ 112 повністю пригнічувалося утворення біоплівки зазначеним патогеном. Усі експериментальні зразки після 6-місячного зберігання активно впливали і на тест-культуру слаботоксигенного представника *C.d. gravis* tox+ 108. Відсутність формування біоплівок даним

absence of the impact of the studied BACs on biofilm formation by pathogen was evaluated by the change in OD of the test culture in the studied sample as compared with the control. The ability of the studied substances to affect the biofilm formation of pathogens was calculated by the formula [19]:

$$OD_{\text{BACs}} = ODm - ODc,$$

where ODm is the mean of experimental strain, ODc is the cut-off value, calculated as follows: $ODc = OD_{\text{нк}} + (3 \times SD_{\text{нк}})$, where ODнк is the mean of negative control, SDнк is the standard deviation of negative control.

This calculation consisted in averaging the results obtained (the mean values of OD were determined for all the studied test strains and negative controls), as well as in establishing the limit value of OD using three standard deviations. When evaluating and comparing the results of biofilm formation in test cultures, calculated by the above formula, the negative control is initial for the whole calculations [19]. All the tests were performed three times in 3 replicates.

The data obtained were processed with 'Excel 2010' software (Microsoft, USA). Differences between indices were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

After 6-month storage in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, all the BACs of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* showed a high ability to inhibit the biofilm formation by test cultures of toxigenic corynebacteria (Fig. 1). Under the samples S impact, a biofilm formation in *C. ulcerans* tox+ 112 was significantly decreased by 5.8 times, and after exposure to MS it reduced by 18.7 times vs. the control ($p < 0.05$). Due to the impact of other BACs (L, ML, MSL, LS) on *C. ulcerans* tox+ 112, the biofilm formation by the mentioned pathogen was completely inhibited. All the experimental samples after 6-month storage actively affected the test culture of a weakly toxigenic species of *C.d. gravis* tox+ 108 as well. Absence of biofilm formation by this strain after exposure to the substances of probiotic origin testified to a higher sensitivity of the specified pathogen to experimental BACs.

The results of studying the effect of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* BACs, stored for 6 months under hypothermic conditions $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, on the formation of biofilms by the above toxigenic *Corynebacterium* species are presented in Fig. 2. No significant difference in the reduction of bio-

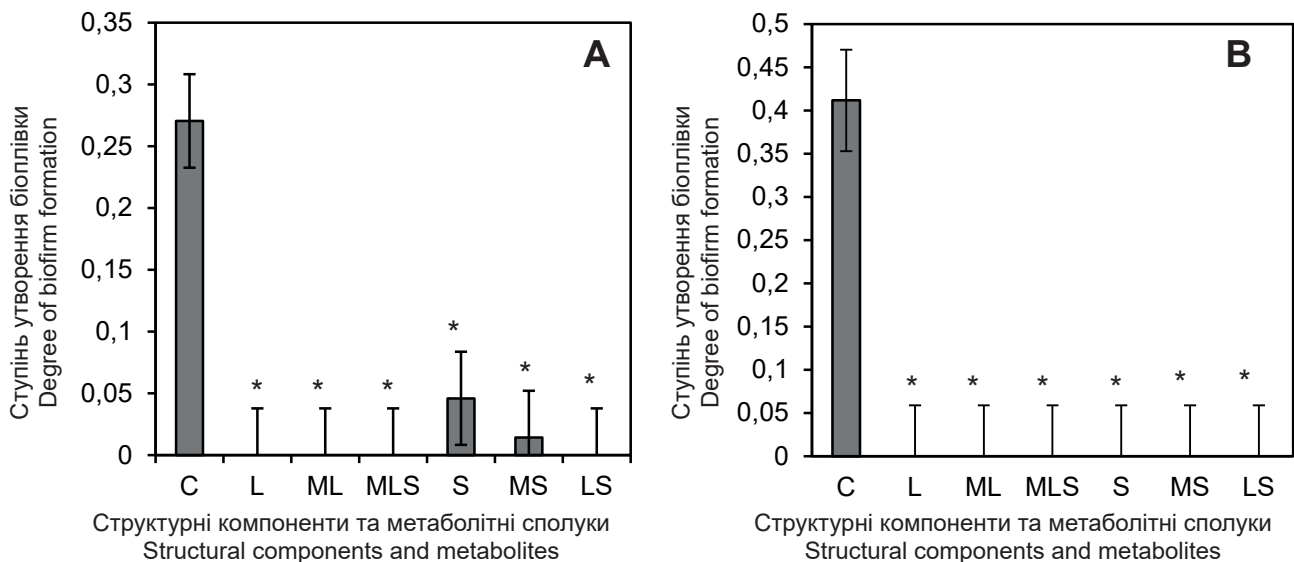


Рис. 1. Вплив біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які зберігалися у замороженому стані протягом 6 місяців, на формування біоплівки токсигенними представниками *Corynebacterium*: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; C – позитивний контроль (утворення біоплівок токсигенними збудниками *Corynebacterium* у присутності фізіологічного розчину натрію хлориду); L – структурні компоненти *L. rhamnosus* GG, отримані після обробки мікробних клітин лактобактерій ультразвуковим опроміненням; ML – метаболіти (метаболітні сполуки) лактобактерій; MLS – комбінація метаболітів сахароміцетів і лактобактерій; S – структурні компоненти *S. boulardii*, отримані після обробки мікробних клітин сахароміцетів ультразвуковим опроміненням; MS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* у структурних компонентах S; LS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах L; * – відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Effect of biologically active complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, stored in a frozen state for 6 months, on the formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* species: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; C – positive control (formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* pathogens in presence of physiological sodium chloride solution); L – structural components of *L. rhamnosus* GG, obtained after treatment of lactobacilli microbial cells with ultrasonic irradiation; ML – metabolites (metabolic compounds) of lactobacilli; MLS – a combination of saccharomycetes and lactobacilli metabolites; S – structural components of *S. boulardii*, obtained after treatment of microbial cells of saccharomycetes with ultrasonic irradiation; MS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in structural components of S; LS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in structural components of L; * – significant differences relative to control, $p < 0.05$.

штамом після впливу речовин пробіотичного походження свідчить про більшу чутливість зазначеного патогену до дослідних БАК.

Результати вивчення впливу БАК *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які зберігалися протягом 6 місяців у гіпотермічних умовах (4 ± 1)°C, на формування біоплівок зазначеними вище токсигенними представниками *Corynebacterium* представлено на рис. 2. Статистично значущої різниці зниження утворення біоплівок патогенами порівняно з контролем не встановлено ($p > 0,05$). Після впливу зразків L, ML, MSL формування біоплівок токсигенними представниками *Corynebacterium* було на рівні контролю або незначуще зменшувалося. Застосування БАК (S, MS, LS) значуще збільшувало формування біоплівок дослідними тест-культурами порівняно з контролем ($p < 0,05$). Відмінностей впливу дослідних проб залежно від штаму токсигенного представника *Corynebacterium* не відмічено.

Після скорочення терміну зберігання при (4 ± 1)°C до 60 діб дані щодо здатності БАК

film formation by pathogens compared with the control was found ($p > 0.05$). After exposure to L, ML, MSL samples, the formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* species was at the control level or slightly decreased. The use of BACs (S, MS, LS) significantly increased the formation of biofilms by experimental test cultures compared with the control ($p < 0,05$). No differences in the effects of experimental samples depending on the strain of the toxigenic *Corynebacterium* species were observed.

After reducing the shelf life at (4 ± 1)°C to 60 days, the data on the ability of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs to inhibit the formation of biofilms by corynebacteria differed from the previous ones (Fig. 3). A significant decrease in the formation of biofilms by both test cultures compared to the control ($p < 0.05$) was observed after exposure to S in 1.6 and 7.8 times depending on the sensitivity of the experimental strain.

Metabolic compounds of saccharomycetes significantly reduced the biofilm formation in one



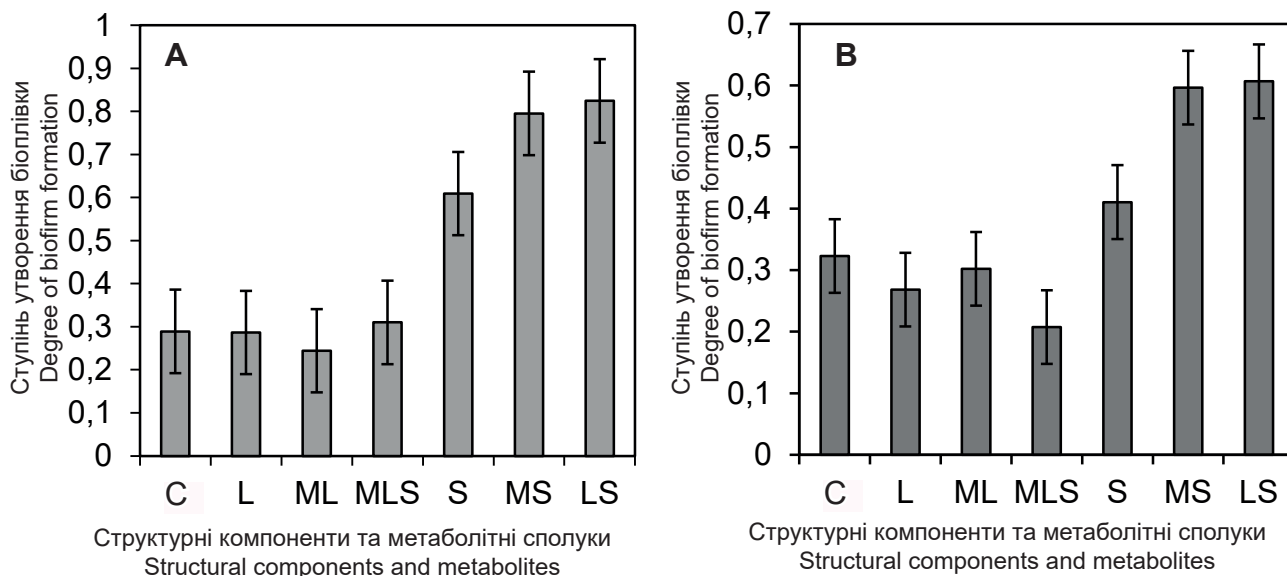


Рис. 2. Вплив біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які зберігалися у гіпотермічних умовах протягом 6 місяців, на формування біоплівки токсигенними представниками *Corynebacterium*: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; К – позитивний контроль (утворення біоплівок токсигенними збудниками *Corynebacterium* у присутності фізіологічного розчину натрію хлориду); L – структурні компоненти *L. rhamnosus* GG, отримані після обробки мікробних клітин лактобактерій ультразвуковим опроміненням; ML – метаболіти (метаболітні сполуки) лактобактерій; MLS – комбінація метаболітів сахароміцетів та лактобактерій; S – структурні компоненти *S. boulardii*, отримані після обробки мікробних клітин сахароміцетів ультразвуковим опроміненням; MS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах S; LS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах L; $p < 0,05$.

Fig. 2. Effect of biologically active complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, stored under hypothermic conditions for 6 months, on the formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* species: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; C – positive control (formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* pathogens in the presence of saline sodium chloride); L – structural components of *L. rhamnosus* GG, obtained after treatment of lactobacilli microbial cells with ultrasonic irradiation; ML – metabolites (metabolic compounds) of lactobacilli; MLS – a combination of saccharomycetes and lactobacilli metabolites; S – structural components of *S. boulardii*, obtained after treatment of microbial cells of saccharomycetes with ultrasonic irradiation; MS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in the structural components of S; LS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in the structural components of L; $p < 0.05$.

L. rhamnosus і *S. boulardii* пригнічувати утворення біоплівки коринебактеріями відрізнялися від попередніх (рис. 3). Статистично значуще зниження утворення біоплівок обома тест-культурами порівняно з контролем ($p < 0,05$) спостерігалось після впливу S у 1,6 та 7,8 разів залежно від чутливості дослідного штаму.

Метаболітні сполуки сахароміцетів значуще зменшували формування біоплівки у одного із патогенів *Corynebacterium* ($p < 0,05$) в 18,5 раз відносно контролю, а у другого (більш чутливого до БАК представника коринебактерій) відмічене повне пригнічення утворення біоплівки. За умов застосування зразків L, ML, MSL та LS в обох токсигенних штаммах спостерігалось повне (100 %) пригнічення утворення біоплівки. Дослідні речовини, які знаходяться у гіпотермічних умовах протягом меншого часу (60 діб), зберігають антибіоплівкову активність БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii* по відношенню до токсигенних тест-культур *Corynebacterium*. Отримані результати

of the pathogens of *Corynebacterium* ($p < 0.05$) in 18.5 times relative to the control, and in other (more sensitive to BACs corynebacteria species) the biofilm formation was completely inhibited. Under the conditions of application of L, ML, MSL and LS samples in both toxigenic strains, a complete (100%) inhibition of biofilm formation was observed. The test substances being under hypothermic conditions for a shorter time (60 days), retained the antibiotic film activity of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs against toxigenic *Corynebacterium* test cultures. The obtained results coincide with the data presented in Fig. 1 regarding the retention of test substances for a long time (6 months) in a frozen state.

Thus we confirmed the efficiency of storage of the objects under study in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 6 months. All experimental samples of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs retain the ability to reduce the formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* species.

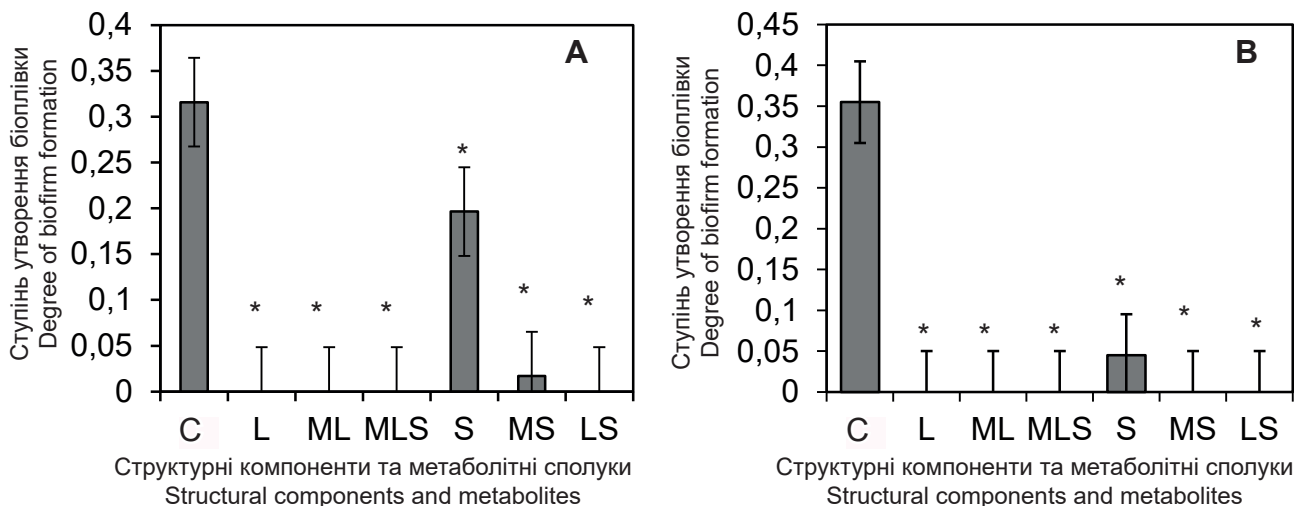


Рис. 3. Вплив біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які зберігалися у гіпотермічних умовах протягом 60 діб, на формування біоплівки токсигенними представниками *Corynebacterium*: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; К – позитивний контроль (утворення біоплівок токсигенними збудниками *Corynebacterium* у присутності фізіологічного розчину натрію хлориду); L – структурні компоненти *L. rhamnosus* GG, отримані після обробки мікробних клітин лактобактерій ультразвуковим опроміненням; ML – метаболіти (метаболітні сполуки) лактобактерій; MLS – комбінація метаболітів сахароміцетів та лактобактерій; S – структурні компоненти *S. boulardii*, отримані після обробки мікробних клітин сахароміцетів ультразвуковим опроміненням; MS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах S; LS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах L; * – відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 3. Effect of biologically active complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, stored under hypothermic conditions for 60 days, on the formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* species: **A** – *C. ulcerans* tox+ 112; **B** – *C. d. gravis* tox+ 108; C – positive control (formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* pathogens in the presence of saline sodium chloride); L – structural components of *L. rhamnosus* GG, obtained after treatment of lactobacilli microbial cells with ultrasonic irradiation; ML – metabolites (metabolic compounds) of lactobacilli; MLS – a combination of saccharomycetes and lactobacilli metabolites; S – structural components of *S. boulardii*, obtained after treatment of microbial cells of saccharomycetes with ultrasonic irradiation; MS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in the structural components of S; LS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in the structural components of L; * – significant differences relative to control, $p < 0.05$.

тати співпадають з даними рис. 1 відносно утримання дослідних речовин тривалий час (6 місяців) у замороженому стані.

Отже, нами підтверджено ефективність зберігання об'єктів дослідження в замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ впродовж 6 місяців. Усі дослідні зразки БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii* зберігають здатність до зниження утворення біоплівок токсигенними представниками *Corynebacterium*.

Після витримки зразків відповідний час у гіпотермічних умовах при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ на відміну від зберігання при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ показник антибіоплівкової активності у пробах L, S, ML MSL знижувався, що проявлялося в зменшенні формування біоплівок патогенними коринебактеріями. При цьому зразки MS і LS за таких умов не впливали на скорочення терміну утворення біоплівки зазначеними патогенами й натомість статистично значуще стимулювали формування біоплівок тест-культурами.

На рис. 4 представлено ступінь утворення біоплівок патогенними представниками, які відрізняються від досліджених раніше коринебактерій.

After keeping the samples for a certain time under hypothermic conditions at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ in contrast to storage at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, the index of antibiofilm activity in L, S, ML MSL samples was decreased, that was manifested in a reduced biofilm formation by pathogenic corynebacteria. In this case, the MS and LS samples under such conditions did not affect the reduction of the time of biofilm formation by these pathogens and instead significantly stimulated the formation of biofilms by test cultures.

Fig. 4 shows the degree of formation of biofilms by pathogens that differ from the previously studied corynebacteria. Toxigenic strain of *C. d. gravis* tox+ 149 from the previous toxigenic test culture has a lower level of biofilm formation. The formation of this pathogen biofilm was completely inhibited after exposure to all experimental *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs, stored under hypothermic conditions for 60 days, except S, which did not significantly reduce the time of biofilm formation by pathogenic bacteria.

Test culture *C. d. belfanti* tox+ 147 was less sensitive to experimental samples of *L. rham-*



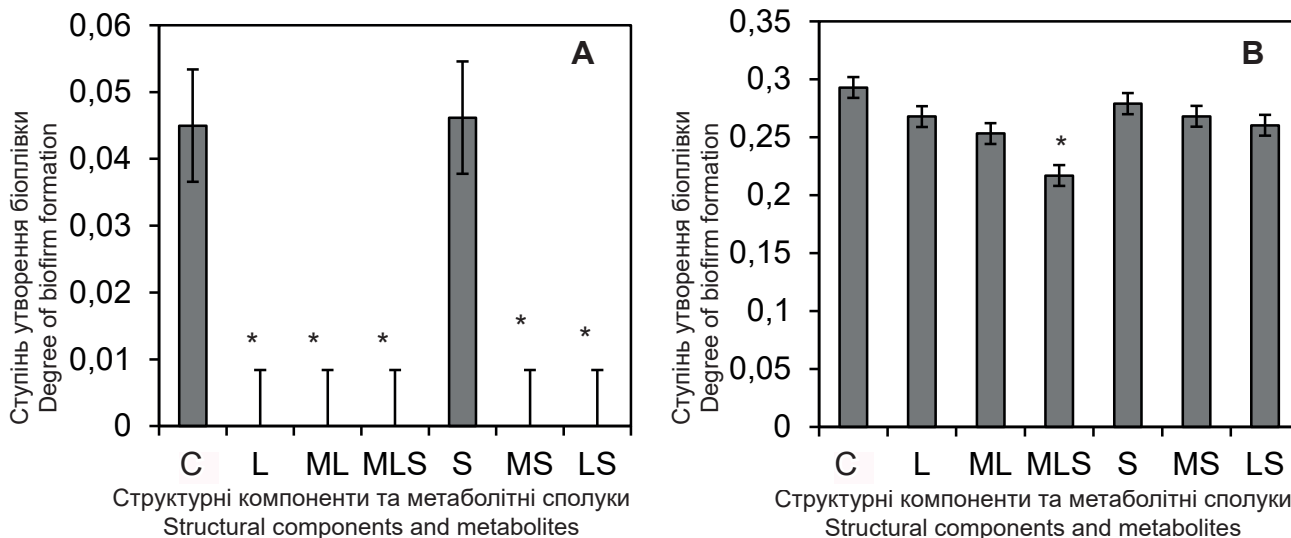


Рис. 4. Вплив біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, які зберігалися у гіпотермічних умовах протягом 60 діб, на формування біоплівки токсигенними представниками *Corynebacterium*: **A** – *C. d. gravis* tox+ 149; **B** – *C. d. belfanti* tox+ 147; К – позитивний контроль (утворення біоплівок токсигенними збудниками *Corynebacterium* в присутності фізіологічного розчину натрію хлориду); L – структурні компоненти *L. rhamnosus* GG, отримані після обробки мікробних клітин лактобактерій ультразвуковим опроміненням; ML – метаболіти (метаболітні сполуки) лактобактерій; MLS – комбінація метаболітів сахароміцетів та лактобактерій; S – структурні компоненти *S. boulardii*, отримані після обробки мікробних клітин сахароміцетів ультразвуковим опроміненням; MS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах S; LS – метаболіти (метаболітні сполуки) сахароміцетів із середовищ культивування *S. boulardii* в структурних компонентах L; * – відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 4. Effect of biologically active complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii*, stored under hypothermic conditions for 60 days, on the biofilm formation by toxigenic *Corynebacterium* species: **A** – *C. d. gravis* tox+ 149; **B** – *C. d. belfanti* tox+ 147; C – positive control (formation of biofilms by toxigenic *Corynebacterium* pathogens in the presence of physiological sodium chloride solution); L – structural components of *L. rhamnosus* GG, obtained after treatment of lactobacilli microbial cells with ultrasonic irradiation; ML – metabolites (metabolic compounds) of lactobacilli; MLS – a combination of saccharomycetes and lactobacilli metabolites; S – structural components of *S. boulardii*, obtained after treatment of microbial cells of saccharomycetes with ultrasonic irradiation; MS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in structural components of S; LS – metabolites (metabolic compounds) of saccharomycetes from *S. boulardii* culture media in structural components of L; * – significant differences relative to control, $p < 0.05$.

Токсигенний штам *C. d. gravis* tox+ 149 порівняно з попередньою токсигенною тест-культурою має більш низький рівень утворення біоплівки. Повне пригнічення формування вказаним патогеном біоплівки спостерігалось після впливу всіх дослідних БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii*, що зберігалися в гіпотермічних умовах протягом 60 діб, окрім S, який статистично значуще не скорочував термін утворення біоплівки патогенними бактеріями.

Тест-культура *C. d. belfanti* tox+ 147 виявляється менш чутливою по відношенню до експериментальних зразків *L. rhamnosus* і *S. boulardii*. Статистично значуще пригнічення (у 1,3 разів) утворення біоплівки токсигенним штамом *C. d. belfanti* tox+ 147 порівняно з контролем ($p < 0,05$) спостерігалось після застосування MSL. Вплив інших дослідних речовин (L, ML, S, MS, LS) на формування біоплівки зазначеною тест-культурою супроводжувався незначущим пригніченням утворення біоплівки мікроорганізмом відносно контролю ($p > 0,05$).

nosus and *S. boulardii*. The biofilm formation by toxigenic strain *C. d. belfanti* tox+ 147 compared with control ($p < 0.05$) was significantly inhibited (1.3 times) after MSL application. The effect of other test substances (L, ML, S, MS, LS) on the biofilm formation by this test culture was accompanied with a slight inhibition of the biofilm formation by the microorganism relative to the control ($p > 0.05$).

The degree of antibiotic effect of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* BACs in relation to pathogenic corynebacteria was found to be stipulated by the sensitivity of bacteria to the experimental samples.

Previously obtained qualitative data on the preservation of antimicrobial properties of derivate-containing filtrates of bifidobacteria after storage in a frozen state was not inferior to that in the newly obtained samples, while the results of the quantitative method showed a more pronounced decrease [13]. The data presented in this paper confirm that the described conditions of keeping

Встановлено, що ступінь антибіоплівкового впливу БАК *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* по відношенню до патогенних коринебактерій обумовлений чутливістю бактерій до дослідних зразків.

Одержані раніше за якісним методом дані щодо збереження протимікробних властивостей дериват-вмісних фільтратів біфідобактерій після зберігання в замороженому стані не поступалися такому у шойно отриманих зразках, при цьому результати кількісного методу показали більш виражене його зниження [8]. Представлені в роботі дані підтверджують, що описані умови утримання БАК *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* у замороженому стані за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ дозволяють зберігати біологічну активність зразків та є перспективними для збереження метабіотиків. Слід зазначити, що тривала витримка дослідного матеріалу пробіотичного походження у гіпотермічних умовах $((4 \pm 1)^\circ\text{C})$ не забезпечує зберігання антибіоплівкової активності зразків лактобактерій і сахароміцетів.

Представлені на рис. 2 дані утворення біоплівки токсигенним штамом *C. d. gravis* tox+ 108 при застосуванні БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii*, після тривалого зберігання в замороженому стані показують найбільше пригнічення формування біоплівки після взаємодії культури з сумішшю метаболітів лактобактерій і сахароміцетів (MSL). Подібні результати максимального зменшення утворення біоплівки *C. d. belfanti* tox+ 147 порівняно з контролем ($p < 0,05$) отримано після впливу аналогічних проб (MSL) (рис. 4). Аналіз представлених результатів підтверджує одержані раніше дані з вивчення протимікробної активності БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii*, які показали високі протидифтерійні властивості відносно штамів *Corynebacterium* spp. tox+, при цьому найбільш вираженою протимікробною дією до патогенних коринебактерій володіла суміш метаболітів лактобактерій і сахароміцетів (MSL).

Можливість речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* пригнічувати планктонні та біоплівкові форми токсигенних *Corynebacterium* має терапевтичне значення. Для боротьби зі збудниками бактерійних інфекцій різного генезу на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотиків перспективним є отримання високоактивних речовин *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* проти планктонних і біоплівкових форм мікроорганізмів. У подальшому планується провести експериментальні дослідження відносно впливу досліджуваних речовин обох форм антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій з метою створення на основі БАК лакто-

L. rhamnosus GG and *S. boulardii* BACs in a frozen state at a temperature of $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ allow to preserve the biological activity of samples and are promising for the preservation of metabolites. It should be noted that long-term exposure of the test material of probiotic origin under hypothermic conditions $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ does not ensure the preservation of antibiofilm activity in the samples of lactobacilli and saccharomycetes.

Fig. 2 shows the formation of a biofilm by a toxigenic strain of *C. d. gravis* tox+ 108 when using *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs, after long-term storage in a frozen state demonstrate the highest inhibition of biofilm formation after the interaction of the culture with a mixture of lactobacilli and saccharomycetes metabolites (MSL). Similar results of the maximum reduction in the formation of biofilm by *C. d. belfanti* tox+ 147 compared with the control ($p < 0.05$) was obtained after exposure to alike samples (MSL) (Fig. 4). The analysis of the presented results confirms the previous findings on studying an antimicrobial activity of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* BACs, which showed high antidiphtheria properties against *Corynebacterium* spp. tox+ strains, herewith a mixture of metabolites of lactobacilli and saccharomycetes (MSL) revealed the most pronounced antimicrobial action against pathogenic corynebacteria.

The ability of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* to inhibit plankton and biofilm forms of toxigenic *Corynebacterium* is of a therapeutic importance. For the control of pathogens of bacterial infections of different genesis on the basis of ultrasonic disintegrates of probiotics, the obtaining of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* highly active substances against plankton and biofilm forms of microorganisms is promising. In future we are planning the experiments to investigate the effects of test substances of both forms of antibiotic-resistant opportunistic bacteria to create on the basis of lactobacilli and saccharomycetes BACs the means of overcoming severe inflammations.

Conclusions

1. The ability of biologically active complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* to reduce the formation of pathogenic corynebacteria biofilms, that can be used to design the drugs, preventing the spread of toxigenic strains of *Corynebacterium* spp. in the focus of a diphtheria infection, has been established.

2. Experimental samples of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* retain the initial inhibitory activity of



бактерій і сахароміцетів засобів подолання важких запальних процесів.

Висновки

1. Встановлено здатність біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* знижувати утворення патогенними коринебактеріями біоплівки, що може бути використано у конструюванні препаратів, призначених для попередження розповсюдження токсигенних штамів *Corynebacterium* spp. в осередку дифтерійної інфекції.

2. Дослідні зразки речовин *L. rhamnosus* і *S. boulardii* зберігають вихідну пригнічуючу активність утворення біоплівки токсигенними представниками *Corynebacterium* за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж 6 місяців, а в гіпотермічних умовах $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ щонайменше 60 діб.

3. Зниження формування біоплівки патогенними коринебактеріями до повного їх пригнічення спостерігалось під впливом різних зразків й залежало від чутливості штаму тест-культури *Corynebacterium* до досліджених біологічно активних комплексів.

4. Найбільш виражене пригнічення формування біоплівки токсигенними штамми *C. d. gravis* tox+ 108 та *C. d. belfanti* tox+ 147 порівняно з позитивним контролем (утворення біоплівки збудниками *Corynebacterium* у присутності розчину натрію хлориду ($p < 0,05$)) відмічено під впливом суміші біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* (MSL).

Література

1. Баснакьян ИА. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. Москва: Медицина; 1992. 188 с.
2. Гладких ПГ. Значение микробных биопленок в инфекционной патологии человека (Обзор). Вестник новых медицинских технологий. [Интернет] 2015 публ. 3–2 [цитовано 16.02.2015]; (1). Доступно на: <http://www.vnmt.ru/Bulletin/E2015-1/5096.pdf>.
3. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін. Вплив продуктів метаболізму *L. rhamnosus* GG на тест-культури стафілококів та коринебактерій. Вісник проблем біології і медицини. 2017; (2): 246–51.
4. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін. Вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків на їхню протимікробну активність. Проблеми криобіології і криомедицини. 2017; 27(4): 311–21.
5. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін. Протимікробна активність продуктів метаболізму *S. boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2017; 54 (3): 50–5.
6. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін.; Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», патентовласник. Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних

biofilm formation by toxigenic *Corynebacterium* species at a temperature of $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 6 months, and in hypothermic conditions $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ for at least 60 days.

3. The decrease in the formation of biofilms by pathogenic corynebacteria to their complete suppression was observed under the influence of different samples and depended on the sensitivity of the *Corynebacterium* test culture strain to the studied biologically active complexes.

4. The most pronounced inhibition of the formation of biofilms by *C. d. gravis* tox+ 108 and *C. d. belfanti* tox+ 147 toxigenic strains compared with the positive control (formation of biofilms by *Corynebacterium* pathogens in the presence of sodium chloride solution ($p < 0.05$)) was observed under the influence of a mixture of biologically active complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* (MSL).

References

1. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4 th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
2. Basnakyan IA. [Cultivation of microorganisms with specified properties]. Moscow: Meditsina, 1992. 188 p. Russian.
3. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. Biochim Biophys Acta. 2016; 1858(5): 1044–60.
4. Chen H, Wubbolts RW, Haagsman HP, et al. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. Sci Rep [Internet]. 2018 Jul 11 [cited 2018 Sep 10]; 8: 10446. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28842-8>
5. Dostert M, Belanger CR, Hancock RE, et al. Design and assessment of anti-biofilm peptides: steps toward clinical application. J Innate Immun. 2019; 11: 193–204.
6. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, et al. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2018; 8(4): 119–27.
7. Gladkih PG. [Importance of microbiofilms in infection pathology of human (Review)]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. [Internet]. 2015 Feb 16 [cited 2018 Feb 16]; (1): publ. 3–2. Available from: <http://www.vnmt.ru/Bulletin/E2015-1/5096.pdf>
8. Isaenko OYu, Knysh OV, Babych EM, et al. [The influence of metabolic products of *L. rhamnosus* GG on the test culture of staphylococci and corynebacteria]. Bulletin of Problems Biology and Medicine. 2017; 2(136): 246–51. Ukrainian.
9. Isaenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al. Influence of storage of probiotic broth culture filtrates on their antimicrobial activity. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 311–21.
10. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al. [Antimicrobial activity of metabolites of *S. boulardii* against test cultures of Staphylococci and Corynebacteria]. Pharmacology and Drug Toxicology. 2017; 54 (3): 50–5. Ukrainian.
11. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al., inventors; Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the

- штамів грибів і бактерій. Патент України на корисну модель № 126603. 25. 06. 2018.
7. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін.; Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», патентовласник. Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій. Патент України на корисну модель № 123122. 12.02.2017.
 8. Книш ОВ, Ісаєнко ОЮ, Бабич ЄМ, та ін. Протимікробна активність дериватів біфідобактерій після зберігання в замороженому стані. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(3): 237–48.
 9. Костюкова НН, Бехало ВА. Дифтерийное бактерионосительство. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2018; 17(5): 60–70.
 10. Рыбальченко ОВ, Бондаренко ВМ, Орлова ОГ, и др. Деорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010; (6): 66–70.
 11. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4 th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
 12. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1858(5): 1044–60.
 13. Chen H, Wubbolts RW, Haagsman HP, et al. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 10446.
 14. Dostert M, Belanger CR, Hancock RE, et al. Design and assessment of anti-biofilm peptides: steps toward clinical application. *J Innate Immun*. 2019; 11: 193–204.
 15. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, et al. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2018; 8(4): 119–27.
 16. Lluch EJ, Garcia V, Kingdon ADH, et al. A simple polymicrobial biofilm keratinocyte colonization model for exploring interactions between commensals, pathogens and antimicrobials. *Front. Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 26 [cited 2020 Jun 20]; 11: 291. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00291/full>
 17. Osama DM, Elkhatib WF, Tawfeik AM, et al. Antimicrobial, antibiofilm and immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some bacterial pathogens. *IJBWI*. 2017; 6(1): 12–21.
 18. Somma AD, Moretta A, Canè C, et al. Antimicrobial and antibiofilm peptides. *Biomolecules* [Internet]. 2020 apr 23 [cited 2021 Mar 10]; 10(4): 652. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/652>
 19. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 115(8): 891–9.
 20. Wu BC, Haney EF, Akhoundsadegh N, et al. Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. *Biofilms and Microbiomes*. 2021; 7(1): 5–13.
 - National Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. [Method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria]. Patent of Ukraine N 126603. 2018 Jun 25. Ukrainian.
 12. Isayenko OYu, Knysch OV, Babych YeM, et al., inventors; Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. [Method for obtaining metabolites of probiotic strains of bacteria]. Patent of Ukraine N 123122. 2017 Feb 12. Ukrainian.
 13. Knysch OV, Isaenko OYu, Babych EM, et al. Antimicrobial activity of bifi dobacteria derivatives after storage in a frozen state. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(3): 237–48.
 14. Kostyukova NN, Bechalo VA. Diphtheria carriage. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018; 17(5): 60–70. Russian.
 15. Lluch EJ, Garcia V, Kingdon ADH, et al. A simple polymicrobial biofilm keratinocyte colonization model for exploring interactions between commensals, pathogens and antimicrobials. *Front. Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 26 [cited 2020 Jun 20]; 11: 291. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00291/full>
 16. Osama DM, Elkhatib WF, Tawfeik AM, et al. Antimicrobial, antibiofilm and immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some bacterial pathogens. *IJBWI*. 2017; 6(1): 12–21.
 17. Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, et al. [Disorganization of biofilms of clinical staphylococcal strains by lactobacillus metabolites]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii*. 2010; 6: 66–70. Russian.
 18. Somma AD, Moretta A, Canè C, et al. Antimicrobial and antibiofilm peptides. *Biomolecules* [Internet]. 2020 apr 23 [cited 2021 Mar 10]; 10(4): 652. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/652>
 19. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 115(8): 891–9.
 20. Wu BC, Haney EF, Akhoundsadegh N, et al. Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. *Biofilms and Microbiomes*. 2021; 7(1): 5–13.

