

# Протимікробна активність структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* щодо *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853

О. Ю. Ісаєнко <sup>1</sup>, О. В. Коцар <sup>2,3</sup>, Т. М. Рижкова <sup>3</sup>, Є. М. Бабич <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків, <sup>2</sup>Харківський національний медичний університет, Україна, <sup>3</sup>Харківська державна зооветеринарна академія, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

## Ключові слова:

метаболіти, структурні компоненти, протимікробні властивості, сахароміцети, лактобактерії, референтні штами.

Запорізький медичний журнал. 2020. Т. 22, № 4(121). С. 540-546

\*E-mail: el.isaenko@ukr.net

**Мета роботи** – визначити чутливість референтних штамів до структурно-метаболітних комплексів окремо *Lactobacillus rhamnosus* GG і в комбінації з *Saccharomyces boulardii* для обґрунтування можливості створення протимікробних препаратів із поліфункціональною активністю.

**Матеріали та методи.** Структурно-метаболітні комплекси лактобактерій і сахароміцетів одержували авторським способом без використання живильних середовищ. Мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) і мінімальні бактерицидні концентрації (МБЦ) визначали мікротомом серійних розведень у рідкому живильному середовищі в 96-луночковому планшеті. Для встановлення МІК спектрофотометрично вимірювали оптичну щільність зразків за допомогою аналізатора «Lisa Scan™ EM» (Erba Mannheim, Чеська Республіка), а для МБЦ робили висів на тверде живильне середовище. Концентрації досліджуваних речовин перебували в діапазоні від 1,10 до 0,02 мг/мл за загальним білком. Тест-культурами були референтні штами *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Результати.** Встановлена прямопропорційна залежність протимікробного ефекту від тривалості експозиції, концентрації та активності структурно-метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів. Мінімальна бактерицидна концентрація фільтратів лактобактерій для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,27 мг/мл білка, а лактобактерій і сахароміцетів – 0,21 мг/мл білка. Структурно-метаболітний комплекс *Lactobacillus* із концентрацією 0,14 мг/мл білка також бактерицидно діяв на культуру *P. aeruginosa* ATCC 27853. Найменші випробувані концентрації дослідних фільтратів *Lactobacillus rhamnosus* GG (0,03 мг/мл білка) та комбінації з *Saccharomyces boulardii* (0,02 мг/мл білка) викликали зниження оптичної щільності референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 77,16–82,30 %, 51,25–52,78 %, 31,43–31,58 % ( $p \leq 0,01$ ) відповідно. Мінімальні бактерицидні концентрації відповідали мінімальним інгібувальним концентраціям.

**Висновки.** У результаті досліджень визначили чутливість штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 до обох структурно-метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів. Отримані мінімальні інгібувальні/бактерицидні концентрації дослідних фільтратів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* стануть у нагоді для створення перспективних протимікробних препаратів для альтернативної або додаткової терапії при захворюваннях різного генезу.

## Key words:

metabolites, structural components, antimicrobial properties, saccharomycetes, lactobacteria, reference strains.

Zaporozhye medical journal 2020; 22 (4), 540-546

## Antimicrobial activity of structural-metabolic complexes of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853

O. Yu. Isaenko, O. V. Kotsar, T. M. Ryzhkova, Ye. M. Babych

**The aim of the work** – to determine the sensitivity of reference strains to structural-metabolic complexes of both *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with *Saccharomyces boulardii* to justify the possibility of developing antimicrobial drugs with polyfunctional activity.

**Materials and methods.** Proprietary structural-metabolic complexes of lactobacteria and lactobacteria with saccharomycetes were obtained without the use of culture media. Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) were determined by the serial dilution micromethod in a culture medium in a 96-well plate. To estimate the MIC, the optical density of the samples was spectrophotometrically measured using a Lisa Scan™ EM analyzer (Erba Mannheim, Czech Republic), and broth was plated on a solid culture medium for the MBC estimation. The concentrations of the test substances ranged from 1.10 to 0.02 mg/ml by the total protein. The test cultures were reference strains of *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Results.** The antimicrobial effect was found to be in direct proportion to the exposure time, concentration and activity of structural-metabolic complexes of lactobacteria and lactobacteria with saccharomycetes. The MBC of lactobacteria filtrates for *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 was 0.27 mg/ml by protein, and lactobacteria and saccharomycetes – 0.21 mg/ml by protein. The structural-metabolic complex of *Lactobacillus* with a concentration of 0.14 mg/ml by protein also presented bactericidal effect on the culture of *P. aeruginosa* ATCC 27853. The lowest tested concentrations of the studied *Lactobacillus rhamnosus* GG (0.03 mg/ml by protein) filtrates and combinations with *Saccharomyces boulardii* (0.02 mg/ml by protein) caused a decrease in the optical density of the reference strains of *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 by 77.16–82.30 %, 51.25 – 52.78 %, 31.43–31.58 % ( $P \leq 0.01$ ), respectively. The MICs values corresponded to the MBCs.

**Conclusions.** As a result of the studies, the sensitivity of *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 strains to both structural-metabolic complexes of lactobacteria and saccharomycetes was determined. The obtained minimum inhibitory/bactericidal concentrations of the studied filtrates of *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* will be useful in the development of promising antimicrobial agents for alternative or add-on therapies of diseases having various origins.

## Противомикробная активность структурно-метаболических комплексов *L. rhamnosus* GG и *S. boulardii* относительно *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853

Е. Ю. Исаенко, Е. В. Коцарь, Т. Н. Рижкова, Е. М. Бабич

**Цель работы** – определить чувствительность референтных штаммов к структурно-метаболическим комплексам отдельно *Lactobacillus rhamnosus* GG и в комбинации с *Saccharomyces boulardii* для обоснования возможности создания противомикробных препаратов с полифункциональной активностью.

**Материалы и методы.** Структурно-метаболические комплексы лактобактерий и лактобактерий и сахаромикетов получали авторским способом без использования питательных сред. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) и минимальные бактерицидные концентрации (МБЦК) определяли микрометодом серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночном планшете. Для установления МИК спектрофотометрически измеряли оптическую плотность образцов с помощью анализатора «Lisa Scan EM» (Erba Mannheim, Чешская Республика), а для МБЦК делали высеив на твердую питательную среду. Концентрации исследуемых веществ находились в диапазоне от 1,10 до 0,02 мг/мл по общему белку. Тест-культурами были референтные штаммы *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Результаты.** Установлена прямопропорциональная зависимость противомикробного эффекта от продолжительности экспозиции, концентрации и активности структурно-метаболических комплексов лактобактерий и лактобактерий и сахаромикетов. Минимальная бактерицидная концентрация фильтратов лактобактерий для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 составила 0,27 мг/мл белка, а лактобактерий и сахаромикетов – 0,21 мг/мл белка. Структурно-метаболический комплекс *Lactobacillus* с концентрацией 0,14 мг/мл белка также бактерицидно действовал на культуру *P. aeruginosa* ATCC 27853. Наименьшие испытываемые концентрации исследуемых фильтратов *Lactobacillus rhamnosus* GG (0,03 мг/мл белка) и комбинации с *Saccharomyces boulardii* (0,02 мг/мл белка) вызывали снижение оптической плотности референтных штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 77,16–82,30 %, 51,25–52,78 %, 31,43–31,58 % ( $p \leq 0,01$ ) соответственно. Минимальные бактерицидные концентрации соответствовали минимальным ингибирующим концентрациям.

**Выводы.** В результате исследований определена чувствительность штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 к обоим структурно-метаболическим комплексам лактобактерий и сахаромикетов. Полученные минимальные ингибирующие/бактерицидные концентрации исследуемых фильтратов *L. rhamnosus* GG и *S. boulardii* пригодятся при создании перспективных противомикробных препаратов для альтернативной или дополнительной терапии при заболеваниях различного генеза.

**Ключевые слова:** метаболиты, структурные компоненты, противомикробные свойства, сахаромикеты, лактобактерии, референтные штаммы.

Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, № 4(121). С. 540-546

Ефективність використання монокомпонентних і комбінованих пробіотиків доведена при захворюваннях різної етіології [1–4]. Біологічні препарати, що представлені декількома штамми-антагоністами, передбачають попереднє окреме культивування мікроорганізмів із наступним механічним їх поєднанням або спільно вирощену культуру різних бактеріальних об'єктів. Встановлено розширення спектра протимікробної дії продуцентів унаслідок спільного інкубування різних штамів мікроорганізмів [1,2].

Широким спектром біологічної активності щодо патогенних бактерій, поряд з цілими клітинами пробіотичних культур, володіють й окремі їхні компоненти та продукти життєдіяльності [1,4,5]. Показано, що для отримання функціональних інгредієнтів із широким спектром біологічної активності доцільно отримувати та використовувати гідролізати різних видів мікроорганізмів. Врівні з цільноклітинними пробіотичними штамми компоненти деяких бактеріальних культур (метаболіти та фрагменти клітинних стінок) стимулюють у штамма-антагоніста продукцію антимікробних речовин [6].

Дослідження останніх років показали, що ряд пробіотичних мікроорганізмів продукують бактеріоцини та бактеріоциноподібні речовини, які за механізмом дії близькі до антибактеріальних препаратів і пригнічують зростання клостридій, лістерій, сальмонел, шигел,

синьогнійної палички [5–8]. Лактобацили у процесі метаболізму ще продукують антибіотикоподібні субстанції – лантібіотики, котрі за механізмом дії не відрізняються від бактеріоцинів, але мають меншу чутливість до дії амілаз і протеїназ, містять амінокислоти, які не присутні в бактеріоцинах. Високий рівень протимікробної активності продукти життєдіяльності *Lactobacillus rhamnosus* мають до *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Acinetobacter* sp. і *Arthrobacter* sp. Виразними антибактеріальними властивостями характеризуються метаболіти *Saccharomyces boulardii* стосовно *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*.

### Мета роботи

Визначити чутливість референтних штамів до структурно-метаболических комплексів окремо *Lactobacillus rhamnosus* GG та в комбінації з *Saccharomyces boulardii* для обґрунтування можливості створення протимікробних препаратів із поліфункціональною активністю.

## Матеріали і методи дослідження

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України». Отримання структурно-метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* нового покоління здійснювали авторським способом без використання традиційних живильних середовищ [6,9]. Мікробні клітини *Lactobacillus rhamnosus* GG із симбіотику PREEMA® (Schonen, Швейцарія) та *Saccharomyces boulardii* (з пробіотичного препарату BULARDI®, Schonen, Швейцарія) регідратували в 0,9 % розчині натрію хлориду та вирощували протягом доби при температурі 37 °С. Мікробну масу відмивали 0,9 % розчином натрію хлориду при 1000 г упродовж 30 хвилин не менш ніж тричі.

Для отримання дезінтеграту (структурних компонентів) приготували суспензії *L. rhamnosus* GG з використанням шкали McFarland (10,0 одиниць McF) на приладі Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка) опромінювали низькочастотними ультразвуковими хвилями (генератор ГЗ–109). Обробку здійснювали у водному середовищі в кільцевому пристрої генератора в діапазонах частот  $\Delta f_2 = 35 \pm 50$  кГц ( $f_{\max} = 40,0$  кГц) при амплітуді збудження  $U = 15$  В на навантаженні  $R = 50 \Omega$  ( $P = 5$  Вт). Коефіцієнт перетворення електричної в акустичну потужність становив  $\eta \approx 5$  %, тобто середня потужність акустичних коливань у місці розташування біологічних об'єктів досягала  $0,25 \pm 0,5$  Вт.

Структурні компоненти надалі застосовували для вирощування культур лактобактерій і грибів. Для отримання метаболітів в ультразвуковий дезінтеграт вносили суспензії *L. rhamnosus* GG з оптичною щільністю 10,0 одиниць за шкалою McF або суміш мікробних суспензій *L. rhamnosus* та *S. boulardii* (1:1) з оптичною щільністю 10 одиниць за шкалою McF (посівний матеріал становить 10 % від загального об'єму). Культивування здійснювали при температурі 37 °С у мікроаерофільних умовах протягом 3 діб. Продукти метаболізму *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* центрифугували при 1000 г 30 хвилин, супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм) і використовували для подальших досліджень [6,9].

Матеріал для досліджень 2 зразки: структурно-метаболітичний комплекс *L. rhamnosus* GG (ML), що одержали культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах, та комбінація структурно-метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, що одержана культивуванням спільних культур лактобактерій і сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій (MLS).

Тест-культури для досліджень: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – отримали з колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» (м. Харків). Бактеріальні суспензії готували за допомогою 0,9 % розчину натрію хлориду. Оптична щільність проб відповідає 0,5 одиниці за шкалою McFarland (прилад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка)).

Визначення чутливості референт-штамів бактерій до біологічно активних структурно-метаболітичних комплексів пробіотичних мікроорганізмів здійснювали мікротестом серійних розведень у рідкому живиль-

ному середовищі згідно [10,11]. Методику проводили в полістиролових 96-лункових планшетах виробництва ТОВ «ЕКСІМКАРГОТРЕЙД» (Україна). Метод серійних розведень у рідкому живильному середовищі засновано на використанні подвійних послідовних розведень концентрації дослідних речовин від максимальної до мінімальної. Для ML концентрації становили від 1,1 мг/мл до 0,03 мг/мл білка, а для MLS – 0,83 мг/мл до 0,02 мг/мл білка. Визначення загального білка здійснювали методом Лоурі, згідно з методикою [12]. Колориметричний метод кількісного визначення ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів синього кольору, які утворюються в результаті двох самостійних реакцій. Метод Лоурі засновано на комбінації біуретового методу (утворення забарвленого комплексу пептидних зв'язків із міддю) та методу Фоліна (утворення забарвленого комплексу реактиву Фоліна з ароматичними амінокислотами). Дослідні проби містили різні концентрації структурно-метаболітичних комплексів, рідке живильне середовище (бульйон Мюллер–Хінтона) та бактеріальну суспензію тест-культур. Негативний контроль К (–) – живильне середовище з досліджуваними фільтратами (замість тест-культур додавали 0,9 % розчин натрію хлориду). Позитивний контроль К (+) – живильне середовище з тест-культурами (замість досліджуваного фільтрату додавали 0,9 % розчин натрію хлориду). Вимірювали оптичну щільність вихідних зразків (0 годин) і після інкубування при температурі  $37 \pm 1$  °С через 5 і 22 години. Для встановлення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) структурно-метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* з кожної лунки робили висів на щільне живильне середовище (агар Мюллер–Хінтона). Мінімальною інгібувальною (пригнічувальною) концентрацією (MIK) структурно-метаболітного комплексу з серії послідовних розведень вважали найнижчу концентрацію дослідної речовини, що пригнічувала ріст референтних штамів мікроорганізмів. Облік результатів здійснювали візуально (повне пригнічення видимого росту) та спектрофотометрично (вимірювали оптичну щільність зразків за допомогою аналізатора «Lisa Scantm EM» (Erba Mannheim, Чеська Республіка) при довжині хвилі 630 нм). Для обчислення ступеня інгібування тест-культур структурно-метаболітними комплексами пробіотичних мікроорганізмів використовували формулу:

$$\% \text{ інгібування (пригнічення)} = 100 - \frac{(\text{Од} - \text{Он})}{\text{Оп}} \times 100,$$

де Од – оптична щільність дослідної проби;  
Он – оптична щільність негативного контролю;  
Оп – оптична щільність позитивного контролю [13].

Експериментальні дані наведені як середнє значення ( $\bar{x}$ ) і стандартна помилка середнього (SE). Статистичне порівняння між окремими групами виконали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з поправкою за тестом Бонферроні. Відмінності вважали статистично значущими, коли значення були  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  щодо негативного контролю,  $\$ - p \leq 0,01$ ,  $\# - p < 0,001$  щодо позитивного контролю. Всі експерименти повторювали не менше ніж тричі.



## Результати

Мінімальні інгібувальні концентрації структурно-метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG (ML), який одержали культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах, та комбінації структурно-метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, котру одержано культивуванням спільних культур лактобактерій і сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій (MLS), що пригнічували ріст референтних тест-культур показали відмінні результати (рис. 1).

Під час експериментальних досліджень 5- і 22-годинного впливу фільтратів встановили, що інтенсивність змін залежить від концентрації ML/MLS і тривалості культивування. Оптична щільність дослідних зразків (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) після 5-годинної інкубації у трьох найбільших концентраціях обох структурно-метаболітних комплексів була на рівні з вихідними значеннями та збігалася з показниками негативного контролю, що свідчить про повне пригнічення росту та розмноження тест-культур. Вплив нижчих концентрацій ML/MLS призводив до часткового інгібування збудників: вірогідної різниці щодо показників оптичної щільності позитивного контролю не встановили (рис. 1 а–е). Збільшуючи експозиції культивування до 24 годин, отримали відмінні результати. Проба MLS у концентраціях від 0,83 мг/мл до 0,21 мг/мл білка виявила бактерицидний вплив на штам *P. aeruginosa* ATCC 27853: показники оптичної щільності цих дослідних зразків відповідали значенням негативного контролю ( $0,061 \pm 0,001$ – $0,067 \pm 0,007$ ) (рис. 1 б). Істотний інгібувальний вплив патогенного збудника встановили при концентраціях MLS 0,1 мг/мл і 0,05 мг/мл білка, пригнічення росту зазначеного штаму відбувалося на 56,28 % та 33,97 % відповідно ( $p = 0,01$ ). МІК MLS для *P. aeruginosa* ATCC 27853 становив не більше ніж 0,02 мг/мл білка: зниження оптичної щільності спостерігали до  $0,5268 \pm 0,013$  у порівнянні зі значеннями позитивного контролю  $0,6691 \pm 0,033$ . Ступінь інгібування росту референтного штаму псевдомонад при найменшій випробуваній концентрації MLS становив 31,58 % ( $p = 0,01$ ).

Вищі протимікробні властивості щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853 мала проба ML порівняно зі зразком MLS. Додавання до середовища культивування ML у концентрації від 1,10 мг/мл до 0,14 мг/мл спричиняло найбільшу статистично вірогідну протимікробну дію щодо обраного штаму псевдомонад (рис. 1а). Оптична щільність дослідних проб була на рівні з їхніми вихідними значеннями та показниками негативного контролю ( $0,057 \pm 0,005$ – $0,069 \pm 0,002$ ), що свідчить про 100 % пригнічення росту тест-культури. Після впливу MLS у концентраціях 0,07 мг/мл і 0,03 мг/мл спостерігали статистично вірогідне зниження оптичної щільності експериментальних зразків щодо позитивного контролю. Ступінь інгібування росту досліджуваного збудника псевдомонад найменшими випробуваними концентраціями становив 37,85 % та 31,43 % ( $p \leq 0,01$ ). Отже, протимікробна активність ML щодо повного пригнічення росту *P. aeruginosa* ATCC 27853 проявлялася в концентрації 0,14 мг/мл, а MLS – 0,21 мг/мл.

Застосовуючи ML у концентраціях від 1,10 мг/мл до 0,27 мг/мл білка, спостерігали 100 % інгібування росту *E. coli* ATCC 25922, а 0,07 мг/мл та 0,03 мг/мл

білка – вірогідне зниження оптичної щільності тест-клітин. Інгібування росту референтного штаму ешерихій при зазначених концентраціях ML становило 56,12 % ( $p < 0,001$ ) та 52,78 % ( $p < 0,01$ ) відповідно (рис. 1а). Мінімальна концентрація ML, котра необхідна для повного пригнічення росту *E. coli* ATCC 25922, відрізнялася від аналогічних значень для *P. aeruginosa* ATCC 27853 (0,14 мг/мл білка) та становила 0,27 мг/мл білка.

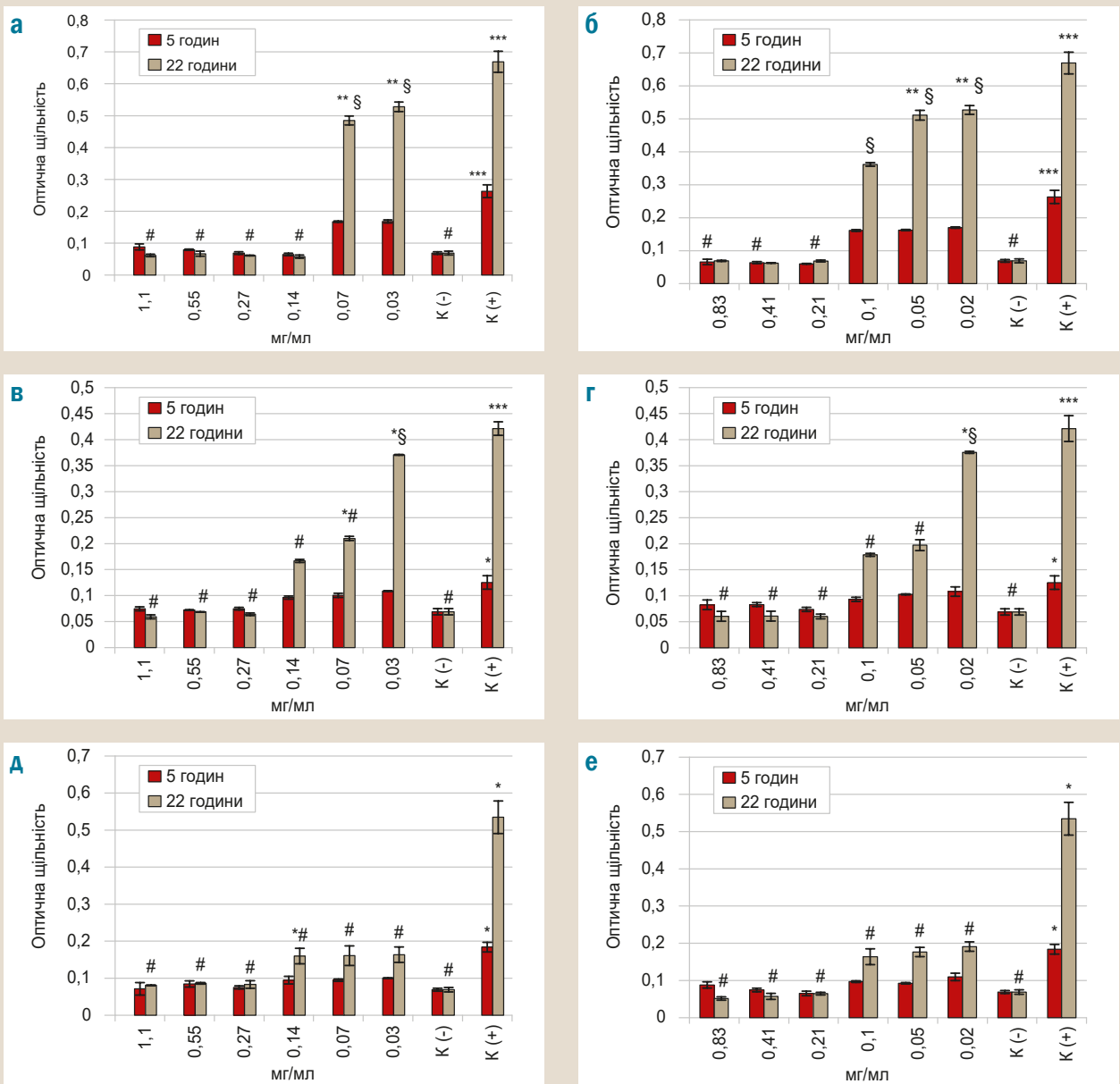
Додавання до середовища інкубації MLS у кількості від 0,83 мг/мл до 0,21 мг/мл за загальним білком супроводжувалося 100 % пригніченням росту *E. coli* ATCC 25922 (рис. 1а). Меншою мірою впливали на зростання та розмноження мікробних клітин зразки MLS із концентраціями 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл і 0,02 мг/мл білка – ступінь інгібування росту становив 65,88 % ( $p < 0,001$ ), 60,07 % ( $p < 0,001$ ) та 51,25 % ( $p \leq 0,01$ ) відповідно. Мінімальна концентрація MLS, що викликала повну елімінацію *E. coli* ATCC 25922, була нарівні з найменшою концентрацією, яка необхідна для 100 % пригнічення росту *P. aeruginosa* ATCC 27853, та становила 0,21 мг/мл білка.

Експозиція *S. aureus* ATCC 25923 у пробах ML із концентраціями від 1,10 мг/мл до 0,27 мг/мл білка сприяла 100 % пригніченню росту зазначеного штаму, а у 0,14 мг/мл білка – зниження кількості порівняно з позитивним контролем на 83,3 % ( $p < 0,001$ ). МІК для обраних концентрацій ML щодо *S. aureus* ATCC 25923 становила не більше ніж 0,03 мг/мл білка: ступінь інгібування росту референтного штаму – на 82,3 % (рис. 1д).

Близьку протимікробну активність щодо *S. aureus* ATCC 25923 проявила проба MLS (рис. 1е). Бактерицидний вплив спостерігали при застосуванні концентрацій від 0,83 мг/мл до 0,21 мг/мл білка. Нижчі концентрації (0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,02 мг/мл білка) виявляли статично вірогідне зниження оптичної щільності дослідних проб порівняно з позитивним контролем. Інгібувальний ефект цих зразків MLS проявлявся загибеллю стафілокока на 86,26 %, 79,88 % та 77,16 % ( $p < 0,001$ ) відповідно.

Мінімальна бактерицидна концентрація (МБЦК) ML для трьох обраних референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,27 мг/мл білка, а для MLS – 0,21 мг/мл білка (табл. 1). Винятком стала проба ML із концентрацією 0,14 мг/мл білка, яка бактерицидно діяла на культуру *P. aeruginosa* ATCC 27853. За результатами дослідження МІК, ML, необхідна для повного пригнічення росту *P. aeruginosa* ATCC 27853, становила 0,14 мг/мл білка, а для *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 – 0,27 мг/мл білка, що відповідає найнижчій бактерицидній концентрації.

Під час аналізу показників виявлена залежність концентрації дослідних фільтратів та вираженості протимікробного ефекту. Коефіцієнт кореляції незалежно від структурно-метаболітного комплексу для *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 дорівнював  $r = 1$ . Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 встановлена сильна пряма кореляційна залежність між концентрацією ML та ступенем інгібування росту збудника ( $r = 1$ ), а для MLS виявлено зворотний кореляційний зв'язок помірної сили ( $r = -0,47046$ ). Також пряму залежність встановлено між інгібуванням росту обраних мікроорганізмів і тривалістю експозиції для двох найменших концентрацій ML та MLS ( $r = 1$ ).



**Рис. 1.** Значення мінімальної інгібувальної концентрації для *P. aeruginosa* ATCC 27853 (а, б), *E. coli* ATCC 25922 (в, г), *S. aureus* ATCC 25923 (д, е), структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG (ML), що одержані культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах (а, в, д), та комбінації структурно-метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, що одержана культивуванням спільних культур лактобактерій і сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій (MLS) (б, г, е), негативного контролю К (-) – живильне середовище з досліджуваними фільтратами, позитивного контролю К (+) – живильне середовище з тест-культурами. Дані оптичної щільності наведені як середнє значення дослідних і контрольних зразків ( $\bar{x} \pm SE$ , n = 3).  
 \*: відмінності достовірні \*: p < 0,05, \*\*: p ≤ 0,01, \*\*\*: p < 0,001 щодо негативного контролю К (-) та §: p ≤ 0,01, #: p < 0,001 щодо позитивного контролю К (+).

**Таблиця 1.** Мінімальна бактерицидна концентрація (МБЦк) для референтних штамів (за наявністю/відсутністю росту на щільному живильному середовищі) структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG, що одержані культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах (ML), та комбінації структурно-метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, що одержана культивуванням спільних культур лактобактерій і сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій (MLS)

Референтні штами	Структурно-метаболітні комплекси	Концентрація дослідних фільтратів за загальним білком, мг/мл (ML/MLS)					
		1,1/0,83	0,55/0,41	0,27/0,21	0,14/0,1	0,07/0,05	0,03/0,02
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	ML	-	-	-	-	+	+
	MLS	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ML	-	-	-	+	+	+
	MLS	-	-	-	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ML	-	-	-	+	+	+
	MLS	-	-	-	+	+	+

-: відсутність росту; +: наявність росту.

## Обговорення

Результати експериментального дослідження щодо встановлення МІК для референтних штамів бактерій структурно-метаболітичних комплексів ML і MLS показали залежність протимікробного ефекту від тривалості експозиції, концентрації та активності дослідних фільтратів *Lactobacillus rhamnosus* GG або з *Saccharomyces boulardii*. Концентрація-залежний вплив структурно-метаболітичних комплексів на вираженість протимікробної дії доведено щодо всіх обраних представників тест-культур мікроорганізмів. Дані, що одержали, переважно сильного кореляційного зв'язку дають можливість стверджувати: виявлена закономірність є причиною змін параметрів (зниження концентрації та зменшення протимікробного ефекту), що відбулися, і не має взаємного зв'язку. Результати узгоджуються з даними досліджень інших авторів, які встановили: ступінь інгібування росту *Staphylococcus aureus* залежить від концентрації нізину (антибіотик, що утворений *Lactococcus lactis*) [13].

Результати дослідження 5- та 22-годинного впливу структурно-метаболітичних комплексів ML і MLS показали, що інтенсивність змін оптичної щільності збудників є прямопропорційною тривалості їхнього інкубування в фільтратах. Отримані результати підтверджують дані, що одержали раніше: рівень протимікробної активності продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів залежить від часу інкубації збудників у досліджуваних речовинах [2].

Нижчі значення МІК щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853 встановлені для проби ML порівняно зі зразком MLS. Представлені результати добре узгоджуються з даними попередніх власних досліджень щодо вивчення протимікробних властивостей структурно-метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*. Встановили, що всі фільтрати лактобактерій і сахароміцетів, які отримані авторським способом, характеризуються високими протимікробними властивостями щодо полірезистентних умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів. Але найбільш виражену протимікробну активність до грамнегативних штамів бактерій мала проба ML, що підтверджено в цій публікації на референтному штамі псевдомонад. Спільне культивування *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* в ультразвуковому дезінтеграторі лактобактерій дало змогу підвищити протимікробні властивості продуктів життєдіяльності до патогенних коринебактерій, завдяки чому найвищий протимікробний ефект щодо штамів  *Corynebacterium spp. tox* + зумовлено MLS [2, 14, 15]. Отже, підтверджено залежність протимікробного ефекту від активності дослідних фільтратів на референс-штамах мікроорганізмів.

## Висновки

1. Мінімальна інгібувальна концентрація ML для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,27 мг/мл білка, а для MLS – 0,21 мг/мл білка. ML із концентрацією 0,14 мг/мл білка також інгібувально діяв на культуру *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Найменші випробувані концентрації обох структурно-метаболітичних комплексів ML (0,03 мг/мл білка) та MLS (0,02 мг/мл білка) викликали інгібування оптичної щільності референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli*

ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 77,16–82,30 %, 51,25–52,78 %, 31,43–31,58 % ( $p \leq 0,01$ ) відповідно.

3. Мінімальні бактерицидні концентрації структурно-метаболітичних комплексів лактобактерій та лактобактерій і сахароміцетів відповідають їхнім мінімальним інгібувальним концентраціям.

4. Отримані структурно-метаболітичні комплекси *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, незважаючи на необхідність дальшого всебічного вивчення, дають можливість розглядати їх як перспективні засоби з можливістю альтернативної або додаткової терапії при захворюваннях різного генезу.

**Перспективи подальших досліджень** передбачають дослідження комбінованого впливу структурно-метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* з антибактеріальними препаратами на полірезистентні умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

## Фінансування

Дослідження є розділом НДР лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітичних комплексів лакто- та біфідопробіотиків» (НАМН 146/2019) № держреєстрації 0119U100686.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 18.11.2019

Після доопрацювання / Revised: 04.03.2020

Прийнято до друку / Accepted: 31.03.2020

## Відомості про авторів:

Ісаєнко О. Ю., канд. мед. наук, провідний науковий співробітник лабораторії профілактики краплинних інфекцій, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

ORCID ID: [0000-0002-5575-1296](https://orcid.org/0000-0002-5575-1296)

Коцар О. В., канд. мед. наук, доцент каф. мікробіології, вірусології та імунології імені Д. П. Гриньова, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-3797-1068](https://orcid.org/0000-0002-3797-1068)

Рижкова Т. М., д-р техн. наук, професор, доцент каф. технології переробки, стандартизації та технічного сервісу, Харківська державна зооветеринарна академія, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8811-5547](https://orcid.org/0000-0001-8811-5547)

Бабич Є. М., д-р мед. наук, професор, зав. лабораторії профілактики краплинних інфекцій, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

ORCID ID: [0000-0002-9382-584X](https://orcid.org/0000-0002-9382-584X)

## Information about authors:

Isaienko O. Yu., MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Respiratory Infections Prevention, State Institution "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

Kotsar O. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after D. P. Grynyov, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Ryzhkova T. M., PhD, DSc, Professor, Associate Professor of the Department of Processing Technology, Standardization and Technical Service, Kharkiv State Zooveterinary Academy, Ukraine.

Babych Ye. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Respiratory Infections Prevention, State institution "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

## Сведения об авторах:

Исаенко Е. Ю., канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики капельных инфекций, ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков.

Коцарь Е. В., канд. мед. наук, доцент каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии имени Д. П. Гринева, Харьковский национальный медицинский университет, Украина.

Рыжкова Т. Н., д-р техн. наук, профессор, доцент каф. технологии переработки, стандартизации и технического сервиса, Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина.

Бабич Е. М., д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией профилактики капельных инфекций, ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков.

## Список літератури

- [1] Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains / T. R. Balabekyan et al. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2018. Vol. 102. Issue 4. P. 933-938. <https://doi.org/10.1111/jpn.12891>
- [2] Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria / O. Y. Isayenko et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10. Issue 1. P. 3-8. <https://doi.org/10.15421/021901>
- [3] Sahib F. H., Aldujaili N. H., Alrufae M. M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces boulardii* and study their biological activities. *European journal of pharmaceutical and medical research*. 2017. Vol. 4. Issue 9. P. 65-74.
- [4] Sarika A. R., Lipton A. P., Aishwarya M. S. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2010. Vol. 2. Issue 5. P. 291-297.
- [5] Семенов А. В. Антагонизм как результат межмикробных отношений. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*. 2013. № 1. С. 1-8.
- [6] Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій : пат. 123122 Україна / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Ківва Ф. В., Горбач Т. В., Балак О. К. № u201708821 ; заявл. 04.09.2017 ; опубл. 12.02.2018, бюл. № 3.
- [7] Усенко Д. В. К вопросу о роли пробиотических продуктов в профилактике заболеваний и сохранении здоровья человека. *Лечащий врач*. 2011. № 7. URL : <https://www.lvach.ru/2011/07/15435244/>
- [8] Lim P. L., Toh M., Liu, S. Q. *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118 enhances the survivability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in an acidic environment. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015. Vol. 99. Issue 16. P. 6803-6811. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6560-y>
- [9] Спосіб комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій : пат. 126603 Україна / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Зачепило С. В., Полянська В. П., Ващенко В. Л., Коваленко О. І., Балак О. К. № u201801032 ; заявл. 05.02.2018 ; опубл. 25.06.2018, бюл. № 12.
- [10] Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/)
- [11] MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. EUCAST. [https://www.eucast.org/mic\\_distributions\\_and\\_ecoffs/](https://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/)
- [12] Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. *The Journal of biological chemistry*. 1951. Vol. 193. Issue 1. P. 265-275.
- [13] Sudagidan M., Yemencioğlu A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. *Journal of food protection*. 2012. Vol. 75. Issue 9. P. 1627-1633. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-001>
- [14] Ісаєнко О. Ю. Протидифтерійні властивості структурнометаболітичних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів у тестах in vitro та in vivo. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65. № 6. С. 51-60. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.051>
- [15] Evaluation of anti-microbial activity of filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* against antibiotic-resistant gram-negative bacteria / O. Y. Isayenko et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10. Issue 2. P. 245-250. <https://doi.org/10.15421/021937>
- [16] The lantibiotic gallidermin acts bactericidal against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and antagonizes the bacteria-induced proinflammatory responses in dermal fibroblasts / T. Bengtsson, J. Lönn, H. Khalaf, E. Palm. *MicrobiologyOpen*. 2018. Vol. 7. Issue 6. P. e00606. <https://doi.org/10.1002/mbo3.606>
- [17] Severina E., Severin A., Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998. Vol. 41. Issue 3. P. 341-347. <https://doi.org/10.1093/jac/41.3.341>
- [18] Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens / K. Sambanthamoorthy et al. *BMC Microbiology*. 2014. Vol. 14. P. 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-197>
- [19] Balabekyan, T. R., Karapetyan, K. J., Khachatryan, T. V., Khachatryan, G. E., & Tatikyan, S. S. (2018). Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(4), 933-938. <https://doi.org/10.1111/jpn.12891>
- [20] Isayenko, O. Y., Knysh, O. V., Babych, Y. M., Ryzhkova, T. N., & Dyukareva, G. I. (2019). Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(1), 3-8. <https://doi.org/10.15421/021901>
- [21] Sahib, F. H., Aldujaili, N. H., & Alrufae, M. M. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces boulardii* and study their biological activities. *European journal of pharmaceutical and medical research*, 4(9), 65-74.
- [22] Sarika, A. R., Lipton, A. P., & Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5), 291-297.
- [23] Semenov, A. V. (2013). Antagonizm kak rezul'tat mezhmikrobynykh otноshenii [Antagonism as a result cross-species interaction between micro-organisms]. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronnyi zhurnal)*, (1), 1-8. [in Russian].
- [24] Isaienko, O. Yu., Knysh, O. V., Babych, Ye. M., Kivva, F. V., Horbach, T. V., & Balak, O. K. (2018). *Sposib одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій [The method of obtaining metabolites of probiotic strains of bacteria]*. Ukraine Patent UA 123122. <https://base.uip.org/search/NV/search.php?action=viewdetails&dbname=inv&lang=ukr&chapter=biblio&sortby=>
- [25] Usenko, D. V. (2011). K voprosu o roli probioticheskikh produktov v profilaktike zabolevani i sokhraneni zdorov'ya cheloveka [On the role of probiotic products in disease prevention and maintaining human health]. *Lechashchii vrach*, (7). <https://www.lvach.ru/2011/07/15435244/> [in Russian].
- [26] Lim, P. L., Toh, M., & Liu, S. Q. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118 enhances the survivability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in an acidic environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6803-6811. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6560-y>
- [27] Isaienko, O. Yu., Knysh, O. V., Babych, Ye. M., Zachepylo, S. V., Polianska, V. P., Vaschenko, V. L., Kovalenko, O. I., & Balak, O. K. (2018). *Sposib kombinatsii metаболітів пробіотичних штамів hryviv i bakterii [Method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria]*. Ukraine Patent UA 126603. <https://base.uip.org/search/NV/search.php?action=viewdetails&dClaim=248674>
- [28] EUCAST. (n.d.). *Antimicrobial susceptibility testing*. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/)
- [29] EUCAST. (n.d.). *MIC and zone diameter distributions and ECOFFs*. [https://www.eucast.org/mic\\_distributions\\_and\\_ecoffs/](https://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/)
- [30] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- [31] Sudagidan, M., & Yemencioğlu, A. (2012). Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. *Journal of food protection*, 75(9), 1627-1633. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-001>
- [32] Isayenko, O. Y. (2019). Protydyferiini vlastyvostrі strukturmеtаbolіtychnykh kompleksiv probіotychnykh shtamiv laktobakteriі i sakharomіtsetiv u testakh in vitro ta in vivo [Anti-diphtheria properties of structural-metabolites complexes of Lactobacteria and Saccharomyces probiotic strains]. *Fiziologichnyi zhurnal*, 65(6), 51-60. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.051> [in Ukrainian].
- [33] Isayenko, O. Y., Knysh, O. V., Kotsar, O. V., Ryzhkova, T. N., & Dyukareva, G. I. (2019). Evaluation of anti-microbial activity of filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* against antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(2), 245-250. <https://doi.org/10.15421/021937>
- [34] Bengtsson, T., Lönn, J., Khalaf, H., & Palm, E. (2018). The lantibiotic gallidermin acts bactericidal against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and antagonizes the bacteria-induced proinflammatory responses in dermal fibroblasts. *MicrobiologyOpen*, 7(6), Article e00606. <https://doi.org/10.1002/mbo3.606>
- [35] Severina, E., Severin, A., & Tomasz, A. (1998). Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41(3), 341-347. <https://doi.org/10.1093/jac/41.3.341>
- [36] Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S., & Paranjayana, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiology*, 14, Article 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-197>