





Отримання метаболічних комплексів пробіотичних мікроорганізмів із вираженими антибактеріальними властивостями

О. Ю. Ісаєнко *^{1,A,C,D,F}, О. В. Коцар ^{2,B}, Т. М. Рижкова ^{3,E,F}, Г. І. Дюкарева ^{4,B}

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків, ²Харківський національний медичний університет, Україна, ³Харківська державна зооветеринарна академія, Україна, ⁴Харківський торговельно-економічний коледж Київського національного торговельно-економічного університету, 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, антибактеріальна активність, сахароміцети, лактобактерії, полірезистентні штами.

Запорізький медичний журнал. 2021. Т. 23, № 1(124). С. 120-125

*E-mail: el_isaenko@ukr.net

Мета роботи – новим авторським способом отримати метаболічні комплекси з вираженими антибактеріальними властивостями та обґрунтувати перспективність їх застосування для конструювання протимікробних поліфункціональних препаратів.

Матеріали та методи. Метаболічні комплекси *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium* одержували культивуванням продуцентів в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів. Визначення до них чутливості антибіотикорезистентних штамів *Escherichia coli* PR і *Staphylococcus haemolyticus* PR здійснювали якісним методом. Суспензію тест-культур (оптична щільність 1,0 од. за шкалою McFarland) після інкубування з метаболітами (2, 24 і 48 годин за температури 37 °С) висівали на агар Мюллера–Хінтона. Відсутність росту свідчила про антибактеріальну активність метаболітного комплексу щодо мікроорганізму.

Результати. Культивування *S. boulardii* в дезінтегратах *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium*, *L. plantarum* у дезінтегратах *L. rhamnosus* / *E. faecium*, а *L. rhamnosus* у дезінтегратах *L. plantarum* супроводжувалося наростанням біомаси обраних мікроорганізмів ($p \leq 0,03$) і продукуванням метаболітів. Разом з однаковим збільшенням клітин *S. boulardii* в дезінтегратах *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium* більшою активністю щодо пригнічення життєдіяльності *E. coli* PR і *S. haemolyticus* PR характеризувалися продукти життєдіяльності, отримані в дезінтегратах лактобактерій та ентерококів. Підвищення рівня антибактеріальної активності свідчить про перевагу нового способу. Поліпшення полягає також у розширенні спектра метаболічних комплексів завдяки культивуванню продуцентів у дезінтегратах інших пробіотиків для отримання оригінальних біологічно активних речовин із високими антибактеріальними властивостями щодо збудників захворювань. До переваг належить і виключення багатоетапності процедури щодо окремого отримання дезінтеграту одного пробіотичного мікроорганізму та продуктів життєдіяльності іншого завдяки об'єднанню різних етапів у єдиний процес.

Висновки. Дезінтеграти як живильні середовища можна використовувати не тільки для власних продуцентів, але і для інших штамів/видів і різних пробіотичних мікроорганізмів (грибів і бактерій). Встановили підвищення антибактеріальних властивостей метаболічних комплексів новим способом отримання. Доведена перспективність конструювання на їхній основі протимікробних поліфункціональних препаратів.

Key words:

metabolites, antibacterial activity, saccharomycetales lactobacillaceae, multiresistant strains.

Zaporozhye medical journal 2021; 23 (1), 120-125

Producing metabolic complexes of probiotic microorganisms with significant antimicrobial properties

O. Yu. Isaenko, O. V. Kotsar, T. M. Ryzhkova, H. I. Diukareva

The aim of the work – to produce metabolic complexes with significant antibacterial properties using a new proprietary method and to substantiate the prospects of their use for designing of antimicrobial polyfunctional drugs.

Materials and methods. Metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium* were obtained by culturing the producers in ultrasonic disintegrates of other probiotic microorganisms. Sensitivity of antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli* PR and *Staphylococcus haemolyticus* PR was determined by qualitative method. The suspension of test-cultures (optical density of 1.0 units on the McFarland scale) after incubation with metabolites (2, 24 and 48 hours at 37 °C) was inoculated into Mueller–Hinton agar. The absence of growth was indicative of the metabolic complexes antibacterial activity against the microorganism.

Results. Cultivation of *S. boulardii* in the *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium* disintegrates, *L. plantarum* – in the *L. rhamnosus* / *E. faecium* disintegrates and *L. rhamnosus* – in the *L. plantarum* disintegrates was accompanied by an increase in the biomass of isolated microorganisms ($P \leq 0.03$) and production of metabolites. Along with a similar increase in *S. boulardii* cells in the *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium* disintegrates, the metabolic products of lactobacterial and enterococcal disintegrates exhibited more active inhibitory effects against *E. coli* PR and *S. haemolyticus* PR. The increased antibacterial activity indicates the advantage of the new method. Another improvement is the extended spectrum of metabolic complexes owing to producer cultivation in the other probiotic disintegrates to obtain original biologically active substances with high antibacterial properties against pathogens. Among the strength of the method is that all the stages are unified into a single process avoiding multiphase procedure for the separate preparation of one probiotic microorganism disintegrate and the metabolic products of another.

Conclusions. Disintegrates as a nutrient medium can be used not only for their own producers, but also for other strains/species and various probiotic microorganisms (fungi and bacteria). The increase in antibacterial activity of metabolic complexes has been found using the new method of production. The prospects of antimicrobial polyfunctional drugs designing on this basis have been proved.

Получение метаболитных комплексов пробиотических микроорганизмов с выраженными противомикробными свойствами

Е. Ю. Исаенко, Е. В. Коцарь, Т. Н. Рижкова, Г. И. Дюкарева

Цель работы – новым авторским способом получить метаболитные комплексы с выраженными антибактериальными свойствами и обосновать перспективность их применения для конструирования противомикробных полифункциональных препаратов.

Материалы и методы. Метаболитные комплексы *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium* получали культивированием продуцентов в ультразвуковых дезинтегратах других пробиотических микроорганизмов. Определение к ним чувствительности антибиотикорезистентных штаммов *Escherichia coli* PR и *Staphylococcus haemolyticus* PR осуществляли качественным методом. Суспензию тест-культур (оптическая плотность 1,0 ед. по шкале McFarland) после инкубирования с метаболитами (2, 24 и 48 часов при температуре 37 °С) высевали на агар Мюллера–Хинтона. Отсутствие роста свидетельствовало об антибактериальной активности метаболитного комплекса по отношению к микроорганизму.

Результаты. Культивирование *S. boulardii* в дезинтегратах *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium*, *L. plantarum* в дезинтегратах *L. rhamnosus* / *E. faecium*, а *L. rhamnosus* в дезинтегратах *L. plantarum* сопровождалось нарастанием биомассы избранных микроорганизмов ($p \leq 0,03$) и продуцированием метаболитов. Наряду с одинаковым увеличением клеток *S. boulardii* в дезинтегратах *S. boulardii* / *L. rhamnosus* / *L. plantarum* / *E. faecium* большей активностью в отношении подавления жизнедеятельности *E. coli* PR и *S. haemolyticus* PR владели продукты жизнедеятельности, полученные в дезинтегратах лактобактерий и энтерококков. Повышение уровня антибактериальной активности свидетельствует о преимуществе нового способа. Улучшение заключается также в расширении спектра метаболитных комплексов благодаря культивированию продуцентов в дезинтегратах других пробиотиков для получения оригинальных биологически активных веществ с высокими антибактериальными свойствами в отношении возбудителей заболеваний. К преимуществам относится и исключение многоэтапности процедуры по отдельному получению дезинтеграта одного пробиотического микроорганизма и продуктов жизнедеятельности другого благодаря объединению различных этапов в единый процесс.

Выводы. Дезинтеграторы в качестве питательной среды можно использовать не только для собственных продуцентов, но и для других штаммов/видов и различных пробиотических микроорганизмов (грибов и бактерий). Установлено повышение антибактериальных свойств метаболитных комплексов новым способом получения. Доказана перспективность конструирования на их основе противомикробных полифункциональных препаратов.

Ключевые слова: метаболиты, дезинтегратор, антибактериальная активность, сахаромикеты, лактобактерии, полирезистентные штаммы.

Запорожский
медицинский журнал.
2021. Т. 23, № 1(124).
С. 120-125

Перспективним є розширення спектра біологічно активних речовин пробіотичного походження [1,2]. Актуальність зумовлена вираженими протимікробними властивостями та широким спектром дії похідних і продуктів життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів щодо патогенних грампозитивних і грамнегативних збудників [3,4]. Привертає увагу їхня висока протимікробна активність щодо антибіотикорезистентних штамів, які становлять особливу небезпеку [5].

Опубліковано багато досліджень щодо метаболітів мікроорганізмів, але всі вони базуються на одержанні цих продуктів на виробничих живильних середовищах [1–5]. Ми виявили новий напрям отримання метаболітних комплексів та їхніх комбінацій із високими протимікробними властивостями за технологією, що виключає застосування виробничих живильних середовищ [6,7].

Для одержання ультразвукового дезинтеграту (структурних компонентів) обрали ультразвуковий чинник низької частоти та низької потужності. Відомо, що височастотний ультразвук (850 кГц) викликає інактивацію *Aureobasidium pullulans* (99 %) [8]. За іншими даними, відсоток загиблих клітин *Mycobacterium* sp. 6PY1 не залежав від потужності ультразвукового чинника, а відрізнявся від його частотного діапазону [8]. Інші автори в результаті сканувальної електронної мікроскопії грибів *Saccharomyces cerevisiae*, що оброблені ультразвуком низької частоти (20 кГц, 124 мкм), не виявили пошкодження їхньої оболонки, але встановили нелетальне внутрішньоклітинне ушкодження, не пов'язане з мембраною. Наступна обробка викликала

пошкодження мембрани (внаслідок кавітації). Повна дезінтеграція клітин повільна [9].

Обрали низькочастотний, низькопотужний прилад для щадного впливу на біологічні об'єкти. Особливість технології полягає в застосуванні низькочастотного ультразвукового чинника малої потужності, який викликає незначне руйнування самих мікробних клітин, а тому, ймовірно, діє передусім на зняття поверхневих структурних компонентів оброблених мікробних об'єктів, зокрема пробіотичних мікроорганізмів [6,7]. Це дає змогу максимально знизити можливість потрапляння внутрішньоклітинного вмісту, склад якого складно контролювати, до дезинтеграту (структурних компонентів) пробіотичних штамів, який надалі використовують як живильне середовище.

Мета роботи

Новим авторським способом отримати метаболітні комплекси з вираженими антибактериальними властивостями та обґрунтувати перспективність їх застосування для конструювання протимікробних поліфункціональних препаратів.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали в лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України». Метаболітні комплекси пробіотичних штамів мікроорганізмів нового покоління отримали авторськими способами без вико-

ристання традиційних живильних середовищ. Описаний раніше спосіб передбачав культивування мікробних клітин пробіотиків у власних ультразвукових дезінтегратах [6,7]. Метаболітні комплекси, отримані в такий спосіб, брали для порівняння. Спосіб, який запропонували, відрізняється вирощуванням продуцентів в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів.

Мікробні клітини *Lactobacillus rhamnosus* GG із симбіотика PREEMA® (Schonen, Швейцарія), *Lactobacillus plantarum* із лікарського засобу Лактобактерин (Біофарма, Україна), *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARD® (Schonen, Швейцарія), *Enterococcus faecium* з лікарського засобу Лінекс® (Lek Pharmaceuticals d. d., Словенія) регідратували в 0,9 % розчині натрію хлориду та вирощували протягом доби за температури 37 °С. Мікробну масу відмивали 0,9 % розчином натрію хлориду при 1000 г упродовж 30 хвилин не менше ніж тричі.

Для отримання дезінтеграта (структурних компонентів) суспензії мікроорганізмів з концентрацією 10,0 одиниці McFarland (прилад Densi-La-Meter PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія) опромінювали низькочастотними ультразвуковими хвилями (генератор ГЗ–109). Обробляли у водному середовищі в кільцевому пристрої генератора в діапазонах частот $\Delta f_2 = 35 \div 50$ 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 $0,25 \div 0,5$ Вт.

Структурні компоненти застосовували для вирощування культур пробіотичних мікроорганізмів. Отримання метаболітів передбачало внесення суспензії продуцентів з оптичною щільністю 10,0 одиниць за шкалою McF в ультразвуковий дезінтеграт (посівний матеріал становить 10 % від загального об'єму). Культивування здійснювали за температури 37 °С в мікроаерофільних умовах протягом 3 діб. Продукти метаболізму центрифугували при 1000 г 30 хвилин, супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм) й використовували для наступних досліджень [6,7].

Матеріал для досліджень: фільтрат ультразвукового дезінтеграта *L. rhamnosus* GG (L_r), метаболітний комплекс *L. rhamnosus* GG (ML_r), одержаний культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах, фільтрат ультразвукового дезінтеграта *L. plantarum* (L_p), метаболітний комплекс *L. plantarum* (ML_p), одержаний культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах, метаболітний комплекс *L. plantarum* (L_pL_r), одержаний культивуванням лактобактерій у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG, метаболітний комплекс *L. plantarum* (EL_p), одержаний культивуванням лактобактерій у дезінтегратах *E. faecium*, фільтрат ультразвукового дезінтеграта *S. boulardii* (S), метаболітний комплекс *S. boulardii* (MS), одержаний культивуванням сахароміцетів у власних дезінтегратах, метаболітний комплекс *S. boulardii* (LS), одержаний культивуванням сахароміцетів у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG, фільтрат ультразвукового дезінтеграта *E. faecium* (E), метаболітний *E. faecium* (LE), одержаний культивуванням ентерококів у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG, метаболітний *E. faecium* (L_pE),

одержаний культивуванням ентерококів у дезінтегратах *L. plantarum*.

Тест-культури для досліджень: антибіотикорезистентні штами *Escherichia coli* PR і *Staphylococcus haemolyticus* PR (до левофлоксацину, цефтріаксону, ципрофлоксацину, ампіциліну тощо), отримані з колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» (м. Харків, Україна). Суспензії мікроорганізмів готували за допомогою 0,9 % розчину натрію хлориду. Оптична щільність проб відповідала 1,0 одиниці за шкалою McFarland (прилад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія)).

Чутливість бактерій до метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів визначали якісним методом [10]. Суспензію тест-культури вносили у співвідношенні 1:9 у фільтрат із метаболітами – дослідні проби; в 1 % цукровий м'ясо-пептонний бульйон і в 0,9 % розчин натрію хлориду – контрольні проби. Експозиція тест-культур у досліджуваних фільтратах становила 2, 24 та 48 годин за температури 37 ± 1 °С. Із рідкого середовища здійснювали висів на щільне живильне середовище (агар Мюллера–Хінтона). Відсутність росту тест-культури на щільному середовищі свідчила про антибактеріальну активність дослідного фільтрату щодо певного мікроорганізму.

Результати експериментальних даних опрацювали статистично за допомогою Microsoft Office Excel 2007 і Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Гіпотезу про нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Пірсона. Якщо розподіл відповідав нормальному, вірогідність різниці між показниками груп визначали за допомогою критерію t-Ст'юдента з поправкою Бонферроні. Результати наведені як середнє значення (\bar{x}) і стандартне відхилення (SD). Відмінності між групами вважали вірогідними, якщо $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Експеримент повторювали 4–5 разів.

Результати

Результати наростання біомаси мікробних клітин *S. boulardii* під час культивування у власному ультразвуковому дезінтеграті, що здійснювалося за описаним раніше способом, показали збільшення КУО на $\sim 3,5$ Іг КУО/мл ($p < 0,001$) (табл. 1). Отримання метаболітів сахароміцетів в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів, як-от *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *E. faecium*, за запропонованим методом також супроводжувалося статистично вірогідним збільшенням життєздатних клітин пробіотика на $\sim 3,5$ Іг КУО/мл ($p < 0,01$) (табл. 1). Отже, кількість мікробних клітин пробіотичного штаму *S. boulardii* у разі їх вирощування в дезінтегратах сахароміцетів, дезінтегратах лактобактерій та ентерококів близька. Культивування клітин *L. plantarum* у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG (L_pL_r) і дезінтегратах *E. faecium* (EL_p), а *L. rhamnosus* у дезінтегратах *L. plantarum* (L_pL_r) також спричиняло наростання біомаси обраних мікроорганізмів ($p \leq 0,03$). Але інкубація штамів бактерій і грибів у дезінтегратах не завжди супроводжувалася збільшенням КУО мікроорганізмів і продукуванням метаболітних сполук. Так, не спостерігали зростання й розмноження мікробних клітин

E. faecium в ультразвукових дезінтегратах *L. plantarum*, *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, а *L. plantarum* у дезінтегратах *S. boulardii*. У роботі описано комбінації похідних і мікробних клітин пробіотиків, коли спостерігали збільшення біомаси мікробних клітин, а отже виділення в середовище культивування продуктів життєдіяльності продуцентів.

Усі наведені метаболітні комплекси за антибактеріальними властивостями є високоактивними речовинами (табл. 2). Ультразвукові дезінтеграти лактобактерій (L_r) і (L_p) і сахароміцетів (S) за антибактеріальною активністю поступаються метаболітам (ML_r), (ML_p), (MS) щодо *E. coli* (24-годинна інкубація). Це свідчить, що процес з отримання метаболітних комплексів мікроорганізмів характеризується отриманням активнішого кінцевого продукту, чистого від залишків живильних середовищ. Це відбувається завдяки простій технології, що передбачає заміну традиційного живильного середовища дезінтегратам пробіотичного походження.

Новий спосіб щодо вирощування продуцентів в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів дав змогу підвищити ефективність продуктів життєдіяльності (табл. 2). Так, культивування мікробних клітин сахароміцетів у дезінтегратах *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* дало змогу одержати біологічно активні речовини з вираженішими протимікробними властивостями щодо пригнічення життєдіяльності полірезистентних штамів *E. coli* PR і *S. haemolyticus* PR упродовж 2 годин інкубації, ніж метаболітні комплекси, отримані попереднім способом.

У результаті досліджень встановили дві функції, які виконує ультразвуковий дезінтеграт: живильного середовища для пробіотичних мікроорганізмів і бактерицидну дію щодо антибіотикорезистентних грампозитивних і грамнегативних збудників захворювань. Уперше доведено: дезінтеграт як живильне середовище можна застосовувати не тільки для власних продуцентів, але і для інших штамів/видів, і навіть різних пробіотичних мікроорганізмів, зокрема грибів і бактерій.

Перевага вперше описаного способу полягала в розширенні спектра метаболітних комплексів завдяки культивуванню продуцентів у структурних компонентах інших пробіотичних штамів мікроорганізмів щодо

Таблиця 1. Показники наростання біомаси мікробних клітин пробіотичних мікроорганізмів при їхньому культивуванні в ультразвукових дезінтегратах

Параметр	Одразу після внесення мікробних клітин, $x \pm SD$	Після культивування протягом 3 діб, $x \pm SD$
Дезінтеграт <i>S. boulardii</i> + клітини <i>S. boulardii</i> (MS)		
Ig КУО/мл	6,30 \pm 0,20	9,85 \pm 0,30***
Рівень рН	6,60 \pm 0,20	6,96 \pm 0,30**
Дезінтеграт <i>L. rhamnosus</i> + клітини <i>S. boulardii</i> (L_rS)		
Ig КУО/мл	6,30 \pm 0,20	9,83 \pm 0,50**
Рівень рН	5,90 \pm 0,60	6,55 \pm 0,60**
Дезінтеграт <i>E. faecium</i> + клітини <i>S. boulardii</i> (ES)		
Ig КУО/мл	6,22 \pm 0,30	10,15 \pm 0,30***
Рівень рН	5,90 \pm 0,40	6,80 \pm 0,20*
Дезінтеграт <i>L. rhamnosus</i> + клітини <i>L. plantarum</i> (L_rL_p)		
Ig КУО/мл	7,23 \pm 0,30	10,78 \pm 0,20***
Рівень рН	5,90 \pm 0,30	4,67 \pm 0,09***
Дезінтеграт <i>L. plantarum</i> + клітини <i>S. boulardii</i> (L_pS)		
Ig КУО/мл	6,25 \pm 0,40	9,83 \pm 0,80**
Рівень рН	5,90 \pm 0,40	6,40 \pm 0,40
Дезінтеграт <i>L. plantarum</i> + клітини <i>L. rhamnosus</i> (L_rL_p)		
Ig КУО/мл	6,98 \pm 0,30	8,80 \pm 0,40**
Рівень рН	5,90 \pm 0,40	5,10 \pm 0,10*
Дезінтеграт <i>E. faecium</i> + клітини <i>L. plantarum</i> (EL_r)		
Ig КУО/мл	7,33 \pm 0,40	8,33 \pm 0,40*
Рівень рН	5,80 \pm 0,40	5,20 \pm 0,40*

Відмінності вірогідні щодо показників до культивування *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

отримання оригінальних біологічно активних речовин з антибактеріальною активністю щодо збудників захворювань і підвищенню рівня їхньої активності проти полірезистентних бактерій. До переваг цього способу належить також виключення багатетапності процедури щодо окремого отримання дезінтеграта одного мікроорганізму та продуктів життєдіяльності іншого пробіотичного штаму завдяки об'єднанню різних етапів у єдиний процес.

Для наступних досліджень обрано метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG як найактивніші біологічно активні речовини, а також продукти життєдіяльності *S. boulardii* завдяки збільшенню їхніх протимікробних властивостей за умов культивування сахароміцетів у дезінтегратах лактобактерій та ентерококів.

Таблиця 2. Антибактеріальні властивості ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів щодо антибіотикорезистентних тест-культур (за наявністю/відсутністю росту на щільному живильному середовищі)

Тест-культури	Час експозиції, год	Біологічно активні речовини													ЦБ	ФР
		<i>L. rhamnosus</i> GG				<i>L. plantarum</i>				<i>S. boulardii</i>						
		L_r	ML_r	L_rL_p	L_p	ML_p	L_rL_p	EL_p	S	MS	L_rS	L_pS	ES			
<i>E. coli</i> PR	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>S. haemolyticus</i> PR	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

L_r : фільтрат ультразвукового дезінтеграта *L. rhamnosus* GG; ML_r : метаболітний комплекс *L. rhamnosus* GG, одержаний культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах; L_rL_p : метаболітний комплекс *L. rhamnosus* GG, одержаний культивуванням лактобактерій у дезінтегратах *L. plantarum*; L_p : фільтрат ультразвукового дезінтеграта *L. plantarum*; ML_p : метаболітний комплекс *L. plantarum*, одержаний культивуванням лактобактерій у власних дезінтегратах; L_rL_p : метаболітний комплекс *L. plantarum*, одержаний культивуванням лактобактерій у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG; EL_p : метаболітний комплекс *L. plantarum*, одержаний культивуванням лактобактерій у дезінтегратах *E. faecium*; S: фільтрат ультразвукового дезінтеграта *S. boulardii*; MS: метаболітний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у власних дезінтегратах; L_rS : метаболітний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у дезінтегратах *L. rhamnosus* GG; L_pS : метаболітний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у дезінтегратах *L. plantarum*; ES: метаболітний комплекс *S. boulardii*, одержаний культивуванням сахароміцетів у дезінтегратах *E. faecium*; ЦБ: 1 % цукровий м'ясо-пептонний бульйон; ФР: 0,9 % розчин натрію хлориду; +: наявність росту культури (протимікробний ефект відсутній), -: відсутність росту культури (протимікробний ефект наявний).

Обговорення

Одержання метаболітів ґрунтується на вирощуванні продуцентів у рідких живильних середовищах із наступним відокремленням мікробних клітин від культуральної рідини та очищення метаболітів від компонентів виробничого живильного середовища [11]. Цей технологічний процес складний і відповідальний – повністю очистити продукти життєдіяльності від компонентів живильного середовища неможливо [12]. Внаслідок цього можуть виникати побічні реакції та знижуватися біологічна ефективність застосування препарату. При такому підході отримати стандартизований препарат майже неможливо [12]. Наведений нами раніше спосіб щодо культивування мікробних клітин у власному ультразвуковому дезінтеграторі простий у виконанні та легкий для стандартизування [6]. Він дає змогу виключити додатковий етап очищення, здешевлюючи технологію та зменшуючи час отримання метаболітів. Отже, запропонований раніше спосіб порівняно з наявними методами характеризується низкою переваг: здатністю одержувати метаболіти пробіотичних штамів без використання традиційних живильних середовищ, без їхніх залишків і потреби в очищенні кінцевого продукту, оптимізацією виробничого процесу отримання метаболітів.

Описаний раніше ще один спосіб спільного культивування мікробних клітин бактерій і грибів в ультразвуковому дезінтеграторі пробіотичних мікроорганізмів порівняно з наявними методами одержання метаболітів також характеризується перевагою щодо здатності одержувати комбінацію метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій, що не містить залишків живильного середовища [7]. Він дає змогу раціонально використовувати виробничі ресурси шляхом поєднання послідовних етапів отримання структурних компонентів і продуктів метаболізму; спростити технологію отримання комбінованих біологічно активних речовин завдяки спільному культивуванню різних видів мікроорганізмів; підвищити протидифтерійні властивості метаболітних речовин. Отже, цим способом можна отримувати комбінацію метаболітних комплексів різних пробіотичних мікроорганізмів із високими антибактеріальними властивостями, результати наведені в попередніх публікаціях [4, 13, 14].

Уперше наведено новий спосіб, який відрізняється культивуванням мікробних клітин у дезінтеграторі іншого пробіотичного мікроорганізму, є оригінальним і має низку переваг. Крім того, що можна отримувати кінцевий продукт із високими антибактеріальними властивостями проти патогенних та умовно-патогенних збудників, що не містить залишків поживного середовища, біологічно активні речовини являють собою суміш, яка складається зі структурних компонентів одних пробіотиків і метаболітів інших пробіотичних штамів мікроорганізмів. Отримані метаболітні комплекси характеризуються вираженішою антибактеріальною активністю щодо антибіотикорезистентних збудників, є оригінальними компонентами, які відкривають новий напрям щодо створення на їхній основі нового класу протимікробних поліфункціональних препаратів.

Висновки

1. Уперше запропонували новий спосіб отримання продуктів життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів

завдяки культивуванню мікробних клітин пробіотика в ультразвукових дезінтеграторах іншого виду мікроорганізму.

2. Одержані авторським способом метаболітні комплекси – високоактивні речовини щодо полірезистентних грампозитивних і грамотригативних збудників.

3. Доведено підвищення їхньої антибактеріальної активності запропонованим методом.

4. Метаболітні комплекси з вираженими антибактеріальними властивостями, отримані авторським способом без застосування традиційних живильних середовищ, перспективні щодо конструювання на їхній основі протимікробних поліфункціональних препаратів.

Перспективи подальших досліджень передбачають всебічне дослідження метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* щодо їхнього комбінованого застосування з антибактеріальними препаратами щодо полірезистентних умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

Фінансування

Дослідження є розділом НАР ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо-пробіотиків» (НАМН 146/2019), № держреєстрації 0119U100686.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 03.04.2020

Після доопрацювання / Revised: 25.05.2020

Прийнято до друку / Accepted: 09.06.2020

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. Грицьова, 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: [0000-0002-1029-8838](https://orcid.org/0000-0002-1029-8838)

Дюкарева Г. І., канд. техн. наук, викладач циклової комісії харчових технологій та готельно-ресторанної справи, Харківський торговельно-економічний коледж Київського національного торговельно-економічного університету, Україна. ORCID ID: [0000-0002-6279-0859](https://orcid.org/0000-0002-6279-0859)

Information about authors:

Isaienko O. Yu., MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Respiratory Infections Prevention, State Institution "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.

Diukareva H. I., PhD, Lecturer of the Cycle Commission on Food Technologies and Hotel and Restaurant Business, Kharkiv Trade and Economic College of Kyiv National University of Trade and Economics, Ukraine.

Сведения об авторах:

Исаенко Е. Ю., канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики каплевых 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.

Дюкарева Г. И., канд. техн. наук, преподаватель цикловой комиссии пищевых технологий и гостинично-ресторанного дела, Харьковский торгово-экономический колледж Киевского национального торгово-экономического университета, Украина.

Список літератури

- [1] 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>
- [2] Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / R. Geitani, C. Ayoub Moubareck, L. Touqui, D. Karam Sarkis. *BMC Microbiology*. 2019. Vol. 19. Issue 1. Article 54. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1416-8>
- [3] Sharma A., Srivastava S. Anti-Candida activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal Biology*. 2014. Vol. 118. Issue 2. P. 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.006>
- [4] 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>
- [5] Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics / H. Hanchi et al. *Future Microbiology*. 2017. Vol. 12. Issue 3. P. 205-212. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>
- [6] Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій : пат. 123122 Україна / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Ківа Ф. В., Горбач Т. В., Балак О. К. № u201708821 ; заявл. 04.09.2017 ; опубл. 12.02.2018, бюл. № 3.
- [7] Спосіб одержання 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.
- [8] Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment / S. Gao et al. *Water Research*. 2014. Vol. 60. P. 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.038>
- [9] Wordon B. A., Mortimer B., McMaster L. D. Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*. 2012. Vol. 47. Issue 2. P. 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.038>
- [10] Вплив продуктів метаболізму *Lactobacillus rhamnosus* GG на тест-культури стафілококів та коринібактерій / О. Ю. Ісаєнко та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 2. С. 246-251.
- [11] Sharma M., Shukla G. Administration of Metabiotics Extracted From Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 Inhibit Experimental Colorectal Carcinogenesis by Targeting Wnt/ β -Catenin Pathway. *Frontiers in Oncology*. 2020. Vol. 10. P. 746. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00746>
- [12] Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations / S. Soltani et al. *FEMS Microbiology Reviews*. 2021. Vol. 45. Issue 1. P. fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- [13] Ісаєнко О. Ю. Протидифтерійні властивості структурно-метаболітних 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>

- [14] 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>

References

- [1] 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>
- [2] Geitani, R., Ayoub Moubareck, C., Touqui, L., & Karam Sarkis, D. (2019). Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 19(1), Article 54. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1416-8>
- [3] Sharma, A., & Srivastava, S. (2014). Anti-Candida activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal Biology*, 118(2), 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.006>
- [4] Isayenko, O. Y., Knysh, O. V., Babysh, 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>
- [5] Hanchi, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J., Ouellette, M., & Fliss, I. (2017). Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. *Future Microbiology*, 12(3), 205-212. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>
- [6] Isaienko, O. Yu., Knysh, O. V., Babysh, Ye. M., Kivva, F. V., Horbach, T. V., & Balak, O. K. (2018). *Sposib oderzhannia metabolitiv probiotychnykh shtamiv bakterii [The method of obtaining metabolites of probiotic strains of bacteria]*. Ukraine Patent UA 123122. <https://base.uipv.org/search/INV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=244153>
- [7] Isaienko, O. Yu., Knysh, O. V., Babysh, Ye. M., Zachepilo, S. V., Polianska, V. P., Vashchenko, V. L., Kovalenko, O. I., & Balak, O. K. (2018). *Sposib oderzhannia kombinatsii metabolitiv probiotychnykh shtamiv hryviv i bakterii [Method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria]*. Ukraine Patent UA 126603. <https://base.uipv.org/search/INV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=248660>
- [8] Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., & Lewis, G. D. (2014). Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment. *Water Research*, 60, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.038>
- [9] Wordon, B. A., Mortimer, B., & McMaster, L. D. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*, 47(2), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.038>
- [10] Isayenko, O. Yu., Knysh, O. V., Babysh, E. M., Kivva, F. V., Balak, O. K., & Naboychenko, O. A. (2017). Vplyv produktiv metabolizmu *Lactobacillus rhamnosus* GG na test-kultury stafilocokiv ta korynebakterii [The influence of metabolic products of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the test-culture of staphylococcus and corynebacterium]. *Visnyk problem biologii i medytsyny*, (2), 246-251. [in Ukrainian].
- [11] Sharma, M., & Shukla, G. (2020). Administration of Metabiotics Extracted From Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 Inhibit Experimental Colorectal Carcinogenesis by Targeting Wnt/ β -Catenin Pathway. *Frontiers in Oncology*, 10, Article 746. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00746>
- [12] Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), Article fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- [13] Isayenko, O. Y. (2019). Protidyferiinivlastyivosty strukturno-metabolitnykh kompleksiv probiotychnykh shtamiv laktobakterii i sakharomitsetiv u testakh in vitro ta in vivo [Anti-diphtheria properties of structural-metabolites complexes of *Lactobacteria* and *Saccharomyces* probiotic strains]. *Fiziologichnyi zhurnal*, 65(6), 51-61. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.051> [in Ukrainian].
- [14] 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>