

УДК 579.873.13:57.086.13

О.В. Книш^{1*}, О.Ю. Ісаєнко¹, Є.М. Бабич¹, А.М. Компанієць²,
О.В. Пахомов², В.П. Полянська³, С.В. Зачепило³, І.С. Данілова⁴

Протимікробна активність дериватів біфідобактерій після зберігання в замороженому стані

UDC 579.873.13:57.086.13

O.V. Knysh^{1*}, O.Yu. Isaenko¹, E.M. Babych¹, A.M. Kompaniets²,
O.V. Pakhomov², V.P. Polyanska³, S.V. Zachepylo³, I.S. Danilova⁴

Antimicrobial Activity of Bifidobacteria Derivatives After Storage in a Frozen State

Реферат: У роботі досліджено вплив зберігання в замороженому стані структурних та метаболітичних дериватів *Bifidobacterium bifidum* на їхню протимікробну активність. Структурні компоненти отримували шляхом циклічного заморожування-відігріву суспензії пробіотичного штаму біфідобактерій, продукти метаболізму – в процесі культивування біфідобактерій у власному «дезінтеграті». Зразки, що містять структурні та метаболітичні деривати пробіотика, піддавали фільтрації. Протимікробну активність фільтратів визначали якісним і кількісним методами одразу після одержання та зберігання впродовж 60 діб за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ по відношенню до тест-культур: стафілококів, коринебактерій та синьогнійної палички. Результати дослідження показали, що заморожування дозволяє ефективно зберігати протимікробний потенціал фільтратів: відмінності між протимікробною активністю свіжоотриманих фільтратів та тих, що зберігалися в замороженому стані, відсутні за умов застосування якісного методу оцінки. Кількісний метод дозволив виявити статистично значуще зниження протимікробної активності фільтратів після зберігання у замороженому стані. Різниця між кількісними показниками життєздатності тест-культур після експозиції у свіжоотриманих та розморожених фільтратах склала 0,2–0,8 лгу КУО/мл.

Ключові слова: біфідобактерії, деривати біфідобактерій, протимікробна активність, зберігання, заморожування-відігрів.

Реферат: В работе исследовано влияние хранения в замороженном состоянии структурных и метаболитных дериватов *Bifidobacterium bifidum* на их противомикробную активность. Структурные компоненты получали путем циклического замораживания-отогрева суспензии пробиотического штамма бифидобактерий, продукты метаболизма – в процессе культивирования бифидобактерий в собственном «дезинтеграте». Образцы, содержащие структурные и метаболитные дериваты пробиотика, подвергали фильтрации. Противомикробную активность фильтратов определяли качественным и количественным методами сразу после получения и хранения в течение 60 суток при температуре $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ по отношению к тест-культурам: стафилококков, коринебактерий и синегнойной палочки. Результаты исследования показали, что замораживание позволяет эффективно сохранять противомикробный потенциал фильтратов: различия между противомикробной активностью свежеполученных фильтратов и образцов, хранившихся в замороженном состоянии, отсутствуют при условии применения качественного метода оценки. Количественный метод позволил выявить статистически значимое снижение противомикробной активности фильтратов после хранения в замороженном состоянии. Разница между количественными показателями жизнеспособности тест-культур после экспозиции в свежеполученных и размороженных фильтратах составила 0,2–0,8 лгу КОЕ/мл.

Ключевые слова: бифидобактерии, дериваты бифидобактерий, противомикробная активность, хранение, замораживание-отогрев.

Abstract: The effect of storage in a frozen state of structural and metabolic derivatives of *Bifidobacterium bifidum* on their antimicrobial activity was investigated. Structural components were obtained by cyclic freezing-thawing of the suspension of a probiotic strain of bifidobacteria, metabolic products were derived during the cultivation of bifidobacteria in their own 'disintegrate' (product of cells destruction). The samples containing the probiotic structural and metabolic derivatives were filtered. The antimicrobial activity of the filtrates was determined by qualitative and quantitative methods immediately after isolation and storage for 60 days at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ and compared with the test cultures of staphylococci, corynebacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. The results of the study showed that low temperature storage allowed to preserve the antimicrobial potential of filtrates: there was no difference between the antimicrobial activity of fresh filtrates and the samples after storage in a frozen state if assessed with a qualitative method. The quantitative method enabled to reveal a statistically significant decrease in the antimicrobial activity of filtrates after storage in a frozen state. The difference between the quantitative indices of the viability of test cultures after exposure in fresh and frozen-thawed filtrates was 0.2–0.8 lg CFU/ml.

Key words: bifidobacteria, derivatives of bifidobacterias, antimicrobial activity, storage, freeze-thawing.

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

³Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія»

⁴Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

³Ukrainian Medical Stomatological Academy

⁴Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: knysh_oksana@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: knysh_oksana@ukr.net

Надійшла 13.09.2017

Прийнята до друку 11.09.2018

Received September, 12, 2017

Accepted September, 11, 2018

© 2018 O.V. Knysh 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.

Недостатня клінічна ефективність існуючих пробіотиків обумовлює необхідність пошуку шляхів їхнього удосконалення і конструювання пробіотичних препаратів нового покоління [3, 13, 14, 17]. Останнім часом перспективною вважається розробка метабіотиків – препаратів на основі біологічно активних продуктів метаболізму, структурних компонентів клітин пробіотичних мікроорганізмів та сигнальних молекул із відомою хімічною структурою [4, 5, 12, 15, 16, 28]. Метаболіти пробіотичних мікроорганізмів мають стимулюючий вплив на бактерії нормальної мікрофлори людини та протимікробну дію по відношенню до патогенних мікроорганізмів. Вони також виявляють імуномодулюючу, протизапальну, протівірусну та інші види активності [4, 5, 24, 27, 28]. Структурні компоненти бактеріальних клітин (фрагменти клітинних стінок, рибосоми, нуклеїнові кислоти) відносять до біологічно активних речовин імунотропної дії завдяки їхній здатності викликати рецептор-опосередковані каскадні реакції, результатом яких є активація механізмів імунного захисту організму [7, 24]. Для підвищення ефективності метабіотиків до їхнього складу вводять клітинні компоненти бактерій-продуцентів [12].

Біфідобактерії – класичні пробіотичні бактерії, які разом із бактероїдами складають 90–95% від загальної мікробної популяції шлунково-кишкового тракту людини [20]. У процесі росту і життєдіяльності біфідобактерії здатні синтезувати і виділяти в навколишнє середовище велику кількість біологічно активних сполук із різною спрямованістю дії. Такими сполуками є органічні кислоти (молочна, оцтова, мурашина, бурштинова) та бактеріоцини – речовини, які проявляють антибактеріальну активність по відношенню до багатьох облігатних та потенційних збудників інфекційних захворювань людини [2, 4, 20, 25]. Крім того, біологічна активність біфідобактерій забезпечується компонентами клітинної стінки (глікопротеїнами, позаклітинними полісахаридами, фосфо- та гліколіпідами, поверхневими антигенами – комплексами ліпoteйхоєвих кислот та білків) [19, 22]. Таким чином, біфідобактерії можуть бути джерелом надзвичайно цінних речовин та сполук, тому і вважаються об'єктами зі значним біотехнологічним потенціалом [20].

Зазвичай продукти метаболізму отримують шляхом культивування продуцента у рідкому живильному середовищі з наступним відокремленням мікробних клітин від культуральної рідини центрифугуванням, фільтрацією або ультрафільтрацією [8, 11, 18, 24]. Суттєвим недоліком таких способів є наявність у кінцевому продукті за-

The poor clinical efficiency of existing probiotic products rises the need to find the ways of their improvement and/or developing the new probiotic agents [19, 20, 24, 27]. Very promising became recently the development of so-called metabiotics, the agents based on biologically active metabolic products, structural components of probiotic microorganisms and signal molecules with known chemical structure [8, 17, 18, 22, 23, 28]. Probiotic microbial metabolites possess stimulating effect on bacteria of human normal flora and antimicrobial action on pathogenic microorganisms. They also exhibit immunomodulating, anti-inflammatory, antiviral and other activities [7, 8, 21, 23, 28]. The structural components of bacterial cells (fragments of cell walls, ribosomes, nucleic acids) are among the biologically active substances with immunotropic effect because of their ability to induce receptor-mediated cascade reactions, the result of which is activation of organism's immune protection mechanisms [7, 10]. The efficiency of metabiotics could be increased by inclusion of the cell components of bacterial producers [17].

Bifidobacteria are typical probiotic bacteria that together with bacteroids make 90–95% of total microbic population in human digestive tract [6]. During their growth and active life the bifidobacteria are able to synthesize and release numerous biologically active compounds with versatile activities. These compounds are organic acids (lactic acid, acetic acid, formic acid, succinate acid) and bacteriocins, *i. e.* substances that express antibacterial activity towards many obligate or potential infectious agents [3, 6, 14, 28]. Moreover, biological activity of bifidobacteria is provided by the constitutive parts of cell wall (glycoproteins, extracellular polysaccharides, phospho- and glycolipids, cell-surface antigens, *i. e.* the complexes of lipoteichoic acids and proteins) [4, 26]. Thus, bifidobacteria are the source of highly valuable substances and compounds, *i. e.* they are supposed as objects with considerable biological potential [6].

The products of bacterial metabolism are usually obtained by culturing of the producers in nutrient medium and separation of microbial cells and culture liquid by centrifugation, filtration and ultrafiltration [7, 11, 15, 25]. A significant drawback of these methods is the presence of the nutrient medium in the final product. To obtain structural components of bacterial cells one uses chemical, biological and physicochemical ways of disintegration, among those the freeze-thawing is considered as the cheapest and simplest one [5, 7, 12]. We developed the original way of obtaining structural and metabolic derivatives of probiotic strain bacteria without



лишків живильного середовища. Для одержання структурних компонентів бактеріальних клітин традиційно застосовують хімічні, біологічні і фізико-механічні способи дезінтеграції, серед яких заморожування-відігрівання вважається найбільш економічним і простим [9, 21, 24]. Нами розроблено оригінальний спосіб одержання структурних і метаболітних дериватів бактерій пробіотичних штамів без застосування живильних середовищ. Він об'єднує розрізнені технологічні етапи у двоетапну процедуру, яка передбачає отримання «дезінтеграту» (продукт руйнування клітин) пробіотика та подальше культивування клітин продуцента у власному «дезінтеграті» [6]. Відомо, що морфологічні, біохімічні властивості бактерій та характер їхнього метаболізму, а отже, і склад метаболітів, які ними продукуються, залежать від середовища і умов культивування. Тому властивості отриманих новим способом структурних і метаболітних похідних пробіотиків потребують всебічного вивчення. Насамперед, це стосується визначення оптимальних умов зберігання біологічно активних продуктів мікробного походження як з метою застосування на етапах наукових досліджень, так і для впровадження у виробництво. За даними літератури отримані метаболіти та структурні компоненти пробіотичних мікроорганізмів зберігають у ліофілізованому, рідкому та замороженому стані [11, 24]. Наявні у літературних джерелах результати вивчення антагоністичної активності пробіотиків, що зберігалися за різних умов, стосуються клітинних форм [1, 26]. Заморожування таких препаратів вважається одним із ефективних способів збереження пробіотичних, у тому числі і протимікробних, властивостей бактерій [1, 3, 26]. Дослідження біологічних властивостей похідних пробіотиків проводили або одразу після отримання, або лише після зберігання у замороженому стані при -20°C [10, 18, 24]. Тому одержані авторами результати не дають можливості порівняти біологічну активність бактеріальних похідних до та після заморожування і визначити вплив заморожування на імунотропні, протизапальні та протимікробні властивості клітинних похідних. Дане дослідження дозволяє порівняти протимікробний потенціал свіжоотриманих фільтратів та тих, що зберігалися у замороженому стані за температури $(-23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Обраний температурний режим зберігання є доступним для використання як у медичній практиці, так і в торговельних аптечних мережах, оскільки його реалізація можлива в морозильній камері побутового холодильника.

Метою даної роботи було оцінити ефективність зберігання фільтратів, які містять структурні

using the culture media. Single technological steps are combined together in a two-step procedure, and involves the obtaining of probiotic 'disintegrate' (product of cell destruction) and further culturing of producer cells in own 'disintegrate' [9]. It is known that morphological and biochemical properties of bacteria and course of their metabolism metabolism, as well as the yield of metabolites depend on the environment and the conditions of culturing. Thus, the properties of the structural and metabolic derivatives of probiotics obtained by elaborated method require a thorough study. In particular, it involves the determination of optimal storage requirements for biologically active products of microbial origin, either for using in scientific research or for commercial manufacturing. According to the published data the metabolites and structural components obtained from probiotic microorganisms could be stored in frozen-dried, liquid and frozen states [7, 15]. The reported antagonistic activity of probiotics, stored under different conditions, was assessed only for cells [2, 16]. Freezing of such samples is considered as an effective way of preserving both probiotic and antimicrobial properties of bacteria [2, 16, 27]. The biological properties of probiotic derivatives were investigated right after their obtaining or preserving them in a frozen state at -20°C [7, 13, 25]. Therefore the authors' findings do not allow to compare biological activity of bacterial derivatives prior to and after freezing and determine the influence on immunotropic, anti-inflammatory and antimicrobial properties of cell derivatives. The given research allows comparing antimicrobial potential of obtained filtrates and those stored in a frozen state at $(-23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. The selected preservation temperature regimen is easy to be used in medical practice as well as in pharmacies, because its implementation is possible in a deep-freeze of household refrigerator.

The research aim was to evaluate the efficiency of filtrate preservation containing structural and metabolite derivatives of bifidobacteria at $(-23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ over the period of 60 days on their antimicrobial activity.

Materials and methods

The structural components of bifidobacteria were obtained by physical disintegration, *i. e.* cyclic freezing-thawing of bacterial cell suspension [9]. To do this, the commercial strain *B. bifidum* (from medical product Bifidumbacterin, JSC Vivo-Actyv, Ukraine) was suspended in 0.9 % solution of sodium chloride and then cultured for 20–24 hours at $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ in liquid nutrient medium for bifidobacteria [1]. Three-fold washing of microbial mass from culture



та метаболітні деривати біфідобактерій, при температурі $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ впродовж 60 діб за їхньою протимікробною активністю.

Матеріали та методи

Структурні компоненти біфідобактерій отримували за допомогою фізичного методу дезінтеграції – циклічного заморожуванням-відігрівання суспензії бактеріальних клітин [6]. Для цього виробничий штамп *Bifidobacterium bifidum* (з препарату «Біфідумбактерин» (ТОВ «Віво-Актив», Україна) суспендували в 0,9%-му розчині хлориду натрію, культивували протягом 20–24 годин за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ у рідкому живильному середовищі для біфідобактерій [23]. Після триразового відмивання мікробної маси від середовища готували суспензію клітин із оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда за допомогою приладу Densi-La-Meter («Lachema», Чехія). Для одержання «дезінтеграту» суспензію біфідобактерій піддавали 10 циклам заморожування-відігрівання за таким режимом: заморожування – пасивне охолодження у морозильній камері холодильника «Samsung RB29FSRNDSA» до температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, відігрівання – на водяній бані за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ до повного відтавання.

Метаболіти біфідобактерій одержували в процесі вирощування пробіотика у власному «дезінтеграді» [6]. Для цього мікробну суспензію біфідобактерій із оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою МакФарланда вносили в «дезінтеград» у співвідношенні 1:9 та культивували за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ впродовж 72 годин.

«Дезінтеград» та культуру біфідобактерій, яка виросла у «дезінтеграді», для видалення цілих клітин та клітинного дебрису піддавали центрифугуванню при 1000g впродовж 30 хв, а супернатант пропускали через стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм («Владіпор», Росія).

Фільтрати, що містили біологічно активні деривати пробіотика, зберігали у морозильній камері холодильника «Samsung RB29FSRNDSA» при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 60 діб. Розморожували зразки на водяній бані за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ до повного відтавання.

Протимікробну активність фільтратів визначали одразу після їхнього отримання та після зберігання у вищезазначених умовах впродовж 60 діб на тест-культурах: клінічних ізолятах *Staphylococcus epidermidis* № 558; *Corynebacterium xerosis* №41; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ №11, *Corynebacterium diphtheriae belfanti* tox+ №147 (зберігаються в колекції мікроорганізмів лабо-

fluid resulted in procuring the cell suspension with optical density of 10.0 according to the McFarland scale measured with Densi-La-Meter unit (Lachema, Czech Republic). To obtain the 'disintegrate' the suspension of bifidobacteria was exposed to 10 cycles of freeze-thawing according to the following regimen: freezing – passive cooling in freezing chamber of Samsung RB29FSRNDSA refrigerator down to $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, heating – in water bath at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ up to complete thawing.

The metabolites of bifidobacteria were obtained by growing of probiotic in its 'disintegrate' [9]. With this aim the microbial suspension of bifidobacteria with optical density of 10.0 according to the McFarland scale was added into 'disintegrate' in 1:9 ratio and cultured at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 72 hours.

'Disintegrate' and bifidobacteria culture grown in 'disintegrate' were centrifuged at 1000g for 30 minutes in order to remove remained cells and cellular debris, and supernatant was passed through sterile membrane filters with pore diameter of 0.2 micron (Vladipor, Russia).

Filtrates with biologically active derivatives of probiotic were kept in freezing chamber of Samsung RB29FSRNDSA refrigerator at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ over the period of 60 days. The samples were thawed in water bath at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ up to complete thawing.

Antimicrobial activity of filtrates was determined immediately after their procurement and storage under mentioned conditions over the course of 60 days with testing cultures: clinical isolates *Staphylococcus epidermidis* 558; *Corynebacterium xerosis* 41; *Corynebacterium diphtheriae gravis* tox+ 11, *Corynebacterium diphtheriae belfanti* tox+ 147 (from the Collection of Microorganisms of the Laboratory of Respiratory Infections Prevention of IMI NAMS, Kharkiv) and reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (from the Museum of Microorganisms of IMI NAMS, Kharkiv). Microorganisms were grown in culture media, corresponding to the type of microorganisms: 1% sucrose beef-extract broth (SBEB), beef-extract agar (BEA), egg-yolk salt agar (EYSA), blood telluric agar (BTA) [1]. Cultures were synchronized by keeping under hypothermal conditions $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 30 minutes.

Antimicrobial activity of filtrates was studied in liquid medium by qualitative method, specifically in the filtrate of 'disintegrate' or bifidobacteria culture that was grown in its own 'disintegrate'. The bacterial suspension of test-strains with optical density of 1.0 according to the McFarland scale was added to the samples of filtrates in 1:9 ratio. The control samples contained physiological solution of sodium chloride and corresponding testing culture. The experimental



раторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН», м. Харків) та референс-штамах *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (отримані з музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН», м. Харків). Мікроорганізми вирощували на живильних середовищах, які відповідали харчовим потребам мікроорганізмів: 1%-й цукровий м'ясо-пептонний бульйон (цМПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), жовтково-сольовий агар (ЖСА), кров'яно-телуритовий агар (КТА) [23]. Синхронізацію культур здійснювали шляхом витримки в гіпотермічних умовах (4 ± 1)°C впродовж 30 хв.

Дослідження протимікробної активності фільтратів якісним методом проводили у рідкому середовищі, а саме: у фільтраті «дезінтеграції» або фільтраті культури біфідобактерій, що виросла у власному «дезінтеграції». Бактеріальну суспензію тест-штамів із оптичною густиною 1,0 за шкалою МакФарланда додавали до зразків фільтратів у співвідношенні 1:9. Контрольні зразки містили фізіологічний розчин натрію хлориду та відповідну тест-культуру. Дослідні та контрольні зразки інкубували за температури (37 ± 1)°C протягом 2 та 24 годин, після чого їх висівали на тверде живильне середовище. Відсутність росту тест-культури на твердому живильному середовищі свідчала про наявність протимікробної (бактерицидної) активності фільтрату по відношенню до неї, а ріст тест-культури – відсутність зазначеної активності.

Протимікробну активність фільтратів біфідобактерій оцінювали також за кількісним показником життєздатності мікроорганізмів тест-штаму (кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) в одиниці об'єму фільтрату) після добової експозиції. В дослідні зразки фільтратів, які містили деривати біфідобактерій, інокулювали у співвідношенні 9:1 бактеріальні суспензії тест-культур із різною оптичною густиною:

- інокулят А (суспензія бактеріальних клітин із оптичною густиною 0,5 одиниць за шкалою МакФарланда у 10-кратному розведенні фізіологічним розчином натрію хлориду);

- інокулят В (суспензія бактеріальних клітин із оптичною густиною 0,5 одиниць за шкалою МакФарланда);

- інокулят С (суспензія бактеріальних клітин з оптичною густиною 5 одиниць за шкалою МакФарланда).

Контрольні зразки містили інокуляти А, В і С тест-штамів та фізіологічний розчин натрію хлориду у співвідношенні 1:9. З дослідних та контрольних зразків після двогодинної та добової експозиції готували послідовні розведення, з яких здійснювали висів 0,1 мл рідини на поверх-

and control samples were incubated at (37 ± 1)°C for 2 and 24 hours and thereafter were plated on a solid culture medium. The absent growth of test-culture on solid nutrient medium showed the presence of antimicrobial (bactericidal) activity of filtrate in relation to it. The fact of test-culture growth was the sign of absence of the specific activity.

The antimicrobial activity of bifidobacteria filtrates was also evaluated by quantitative index of viability of testing the strain microorganisms (by quantifying colony-forming units (CFU) in volume unit of filtrate) after daily exposure. Bacterial suspensions of test-cultures with different optical density were inoculated at 9:1 ratio into the studied samples of filtrates containing derivatives of bifidobacteria:

- Inoculate A (suspension of bacterial cells with optical density of 0.5 units according to the McFarland scale in a 10-fold dilution by physiological solution of sodium chloride);

- Inoculate B (suspension of bacterial cells with optical density of 0.5 units according to the McFarland scale);

- Inoculate C (suspension of bacterial cells with optical density of 5 units according to the McFarland scale).

The control samples contained inoculates A, B and C of test-strains and physiological solution of sodium chloride at 1:9 ratio. After two hour and one-day-long exposure the serial dilutions from experimental and control samples were prepared, from which 0.1 ml of liquid was inoculated to the surface of solid culture media. Inoculations were kept at (37 ± 1)°C. A day later the quantity of grown colonies was counted, the one of CFU was determined in volume unit of the studied sample and expressed in denary logarithm of CFU/ml.

All the tests were conducted four times. Average values of obtained indices with standard variations were determined. The significance of the difference between the obtained indices was determined by Student's test. The results were statistically processed with Excel 2010 software (Microsoft, USA).

Results and discussion

At the first stage of the research the qualitative method was used to study the influence of preservation of filtrates in a frozen state, containing structural and metabolic derivatives of bifidobacteria, on their antimicrobial activity.

According to the results presented in Table 1 it has been established that antimicrobial activity of filtrates determined by qualitative method after storage in a frozen state does not differ from the one of the filtrates studied after procurement. Exposure in the filtrates



ню твердого живильного середовища. Посіви витримували за температури (37 ± 1)°C. Через добу підраховували кількість колоній, що вирости, визначали кількість КУО в одиниці об'єму дослідного матеріалу та виражали в десятковому логарифмі КУО/мл.

Усі досліді проводили в чотирьох повторях. Визначали середні значення отриманих показників зі стандартними відхиленнями. Значущість різниці між отриманими показниками визначали за критерієм Стьюдента. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням програмного пакета «Excel 2010» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

На першому етапі роботи якісним методом досліджували вплив зберігання у замороженому стані фільтратів, які містять структурні та метаболітні деривати біфідобактерій, на їхню протимікробну активність.

За результатами досліджень, представлених у табл. 1, встановлено, що протимікробна активність фільтратів, визначена якісним методом, після зберігання у замороженому стані не відрізняється від протимікробної активності фільтратів, досліджених одразу після отримання. Експозиція у фільтратах впродовж 2 годин призводить до втрати життєздатності одних тест-культур (*S. epidermidis* №558, *C. xerosis* №41, *C. diphtheriae gravis* tox+ №11) та не викликає втрати здатності до росту і розмноження інших (*S. aureus* ATCC 25923, *C. diphtheriae belfanti* tox+ №147, *P. aeruginosa* ATCC 27853). Після добової експозиції як у свіжоотриманих фільтратах, так і в тих, що зберігалися в замороженому стані, був відсутній ріст усіх обраних тест-культур.

На другому етапі роботи досліджували вплив зберігання в замороженому стані фільтратів, що містять деривати біфідобактерій, на їхню протимікробну активність кількісним методом. Серед тест-культур, досліджених на першому етапі, обрали лише ті, що не втрачали життєздатності після двогодинної експозиції у фільтратах: *S. aureus* ATCC 25923, *C. diphtheriae belfanti* tox+ №147, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Вибір концентрацій клітин в інокулятах був обумовлений, перш за все, необхідністю отримати бактеріостатичний ефект після експозиції тест-культур у фільтратах. У даному випадку є можливість кількісно оцінити відмінності між протимікробною активністю свіжоотриманих фільтратів та тих, що зберігалися. Концентрації клітин в інокулятах були обрані у відповідності до тих, які застосовувалися раніше в аналогічних дослідженнях іншими авторами [18],

for 2 hours leads to the loss of viability in several test-cultures (*S. epidermidis* 558, *C. xerosis* 41, *C. diphtheriae gravis* tox+ 11) and does not provoke the loss of the ability to grow and reproduce in others (*S. aureus* ATCC 25923, *C. diphtheriae belfanti* tox+ 147, *P. aeruginosa* ATCC 27853). After one-day exposure the absence of growth in all the selected testing cultures both in fresh filtrates and frozen-thawed ones was observed.

At the second stage of the study there was investigated the influence of storage of filtrates containing derivatives of bifidobacteria in a frozen state on their antimicrobial activity using quantitative method. Among test-cultures studied at the first stage there were selected only those that did not lost viability after exposing for 2 hours in filtrates: *S. aureus* ATCC 25923, *C. diphtheriae belfanti* tox+ 147, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Cell concentrations in inoculates depended on the observed bacteriostatic effect after exposure of test-cultures in filtrates. In this case there was possible to evaluate quantitatively the differences between antimicrobial activity of fresh filtrates and those after storage. The concentrations of the cells in inoculates were selected in accordance with those used earlier in similar reports [25], distinguished between each other by 1 and 2 orders and exceeded the standardized by regulatory document (Order of Ministry of Healthcare of Ukraine №167 dated of 05.04.2007 about approval of methodical instructions 'Determination of Microorganisms' Sensitivity to Anti-Bacterial Preparations') concentration of testing cultures during determination of microorganisms' sensitivity to anti-bacterial preparations.

The results of the study presented in Table 2 show that after two-hour exposure in fresh bifidobacterium 'disintegrate' filtrate the test-culture *S. aureus* (inoculate A) totally loses the viability. Exposure of staphylococcus test-culture for 2 hours in the rest of the filtrates (both in fresh and frozen-thawed) considerably reduces the quantity of viable cells if compared to the control. Antistaphylococcal activity of frozen-thawed filtrates was significantly lower than those of fresh ones. This is evidenced by much higher quantitative indices obtained after of staphylococcus test-culture storage with different density of inoculates after two-hour exposure in frozen-thawed samples of filtrates if compared with fresh ones. The one-day exposure of staphylococcus test-culture in all the samples of filtrates when using inoculates A and B led to the loss of cell viability, and using inoculate C caused a considerable reduction of qualitative indices of test-culture viability in comparison with the control.



Таблиця 1. Протимікробна активність фільтратів, що містять структурні та метаболітні деривати *B. bifidum*, одразу після отримання та зберігання в замороженому стані, визначена якісним методом

Table 1. Antimicrobial activity of filtrates, containing structural and metabolic derivatives of *B. bifidum* after procuring and storage in a frozen state, determined by qualitative method

Тест-культури Test-cultures	Час експозиції, год Time of exposure, hours	Фільтрати, що містять деривати біфідобактерій Filtrates containing derivatives of bifidobacteria				Контроль (ФР) Control (PS)
		свіжоотримані fresh		після зберігання post storage		
		ФД FD	ФК FC	ФД FD	ФК FC	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	-	-	-	-	+
	24	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	+	+	+	+	+
	24	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	2	-	-	-	-	+
	24	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	2	-	-	-	-	+
	24	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium diphtheriae belfanti tox+</i>	2	+	+	+	+	+
	24	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	+	+	+	+	+
	24	-	-	-	-	+

Примітки: «+» – наявний ріст культури, бактерицидний ефект відсутній; «-» – відсутній ріст культури, бактерицидний ефект наявний; ФР – фізіологічний розчин; ФД – фільтрат «дезінтеграції» біфідобактерій; ФК – фільтрат культури біфідобактерій, що виросла у власному «дезінтеграції»

Notes: «+» presence of the culture growth, without germ-kill effect; «-» missing culture growth, with germ-kill effect; PS – physiological solution; FD – filtrate 'disintegrate' of bifidobacteria; FC – filtrate of bifidobacterium culture grown in its own 'disintegrate'.

відрізнялися між собою на 1 і 2 порядки та перевищували регламентовану нормативним документом (Наказ МОЗ України №167 від 05.04.2007 р. про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів») концентрацію тест-культур при визначенні чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів.

Результати досліджень, наведених у табл. 2, показують, що після двогодинної експозиції у свіжоотриманому фільтраті «дезінтеграції» біфідобактерій тест-культура *S. aureus* (інокулят А) повністю втрачає життєздатність. Експозиція тест-культури стафілококу впродовж 2 годин у решті фільтратів (як свіжоотриманих, так і розморожених) значно зменшує кількість життєздатних клітин порівняно з контролем. Протистафілококова активність

After two-hour exposure of *C. diphtheriae belfanti tox+* 147 with density of inoculate A in filtrates of 'disintegrates' of bifidobacteria the test-culture completely lost their viability and in filtrates of bifidobacterium culture grown in its own 'disintegrate' there was a considerable reduction of viable cell number if compared with the control. Exposure for 2 hours of corynebacterium test-culture with density of inoculates B and C in all the types of filtrates was also accompanied by a strong reduction of bacteria viability if compare with the control. The difference between quantitative indices of corynebacteria viability in fresh and frozen-thawed filtrates was statistically significant, but did not exceed one order and made 0.2–0.8 lg CFU/ml. After one-day-long exposure of corynebacteria in derivative-containing filtrates the test-cultures lost their via-

Таблиця 2. Протимікробна активність фільтратів, що містять структурні та метаболітні деривати *B. bifidum*, одразу після отримання та зберігання в замороженому стані, визначена кількісним методом

Table 2. Antimicrobial activity of filtrates, containing structural and metabolic derivatives of *B. bifidum* after procuring and storage in a frozen state, determined by quantitative method

Тест-культури Test-cultures	Інокулюм Inoculum	Час експозиції, год Time of exposure, hours	Фільтрати, що містять деривати біфідобактерій Filtrates containing derivatives of bifidobacteria				Контроль (ФР) Control (PS)
			після отримання freshly prepared		після зберігання after storage		
			ФД FD	ФК FC	ФД FD	ФК FC	
			lg КУО/мл, M ± σ lg CFU/ml, M ± σ				
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	2	–	1,5 ± 1,7	1,6 ± 1,6	2,3 ± 1,6	6,3 ± 0,21
		24	–	–	–	–	6,1 ± 0,17
	B	2	3,4 ± 0,12	4,0 ± 0,17	3,8 ± 0,17*	4,5 ± 0,16*	7,2 ± 0,29
		24	–	–	–	–	7,0 ± 0,21
	C	2	5,8 ± 0,17	6,0 ± 0,24	6,2 ± 0,24*	6,6 ± 0,22*	8,3 ± 0,22
		24	1,5 ± 1,7	2,25 ± 1,5	2,3 ± 1,56	3,1 ± 0,15	8,2 ± 0,25
<i>Erium diphtheriae belfanti</i>	A	2	–	2,38 ± 1,6	–	3,08 ± 0,15	6,3 ± 0,24
		24	–	–	–	–	5,6 ± 0,22
	B	2	3,15 ± 0,17	3,75 ± 0,22	3,55 ± 0,19*	4,2 ± 0,24*	7,2 ± 0,21
		24	–	–	–	–	6,5 ± 0,25
	C	2	4,2 ± 0,15	4,7 ± 0,18	4,89 ± 0,14*	5,0 ± 0,3*	8,1 ± 0,22
		24	–	0,75 ± 1,5	–	2,25 ± 1,5	7,5 ± 0,22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	2	3,65 ± 0,13	4,9 ± 0,14	4,2 ± 0,15*	5,35 ± 0,1*	6,2 ± 0,32
		24	–	–	–	–	5,8 ± 0,39
	B	2	4,08 ± 0,15	5,3 ± 0,26	4,55 ± 0,1*	5,9 ± 0,14*	7,1 ± 0,27
		24	–	–	–	–	6,7 ± 0,19
	C	2	5,05 ± 0,17	6,1 ± 0,26	5,76 ± 0,15*	6,8 ± 0,22*	8,1 ± 0,26
		24	–	2,37 ± 1,6	–	2,4 ± 1,6	7,9 ± 0,08

Примітки: «–» – ріст мікроорганізмів відсутній; * – відмінності статистично значущі відносно показників до заморожування, $p < 0,05$; ФР – фізіологічний розчин; ФД – фільтрат «дезінтеграції» біфідобактерій; ФК – фільтрат культури біфідобактерій, що виростає у власному «дезінтеграції».

Notes: «–» without growth of microorganisms; * – the differences are statistically significant in respect to the indices prior to freezing, $p < 0.05$; PS – physiological solution; FD – filtrate 'disintegrate' of bifidobacteria; FC – filtrate of bifidobacterium culture grown in its own 'disintegrate'.

розморожених фільтратів значно нижча, ніж свіжоотриманих. Про це свідчать значно вищі кількісні показники збереженості тест-культур стафілококів із різними густинами інокулятив після двогодинної експозиції у розморожених зразках фільтратів, ніж у свіжоотриманих. Добова експозиція тест-культури стафілококу в усіх зразках фільтратів за умови застосування інокулятив А та В призводить до втрати життєздатності, а іноку-

bility, except the case of bifidobacteria culture, grown in its own 'disintegrate'. After an exposure in mentioned filtrate the test-culture of corynebacteria with the highest density of inoculate (C) lost considerably its viability in comparison with control.

Significant differences between antimicrobial activity of fresh and frozen-thawed samples of filtrates were observed after two-hour exposure of test-culture *P. aeruginosa*. Viability of *P. aeruginosa* test-



ляту С – до значного зниження кількісних показників життєздатності тест-культури у порівнянні з контролем.

У результаті двогодинної експозиції *C. diphtheriae belfanti* tox+ №147 із густиною інокуляту А у фільтратах «дезінтегратів» біфідобактерій спостерігалася повна втрата життєздатності тест-культури, а у фільтратах культури біфідобактерій, вирощеної у власному «дезінтеграті», – значне зменшення кількості життєздатних бактерій у порівнянні з контролем. Експозиція впродовж двох годин тест-культури коринебактерій із густинами інокулятів В та С у всіх видах фільтратів теж супроводжувалася значним зниженням кількісного показника життєздатності бактерій у порівнянні з контролем. Причому різниця між кількісними показниками збереженості коринебактерій у свіжоотриманих та розморожених фільтратах є статистично значущою, але не перевищує одного порядку і складає 0,2–0,8 lg КУО/мл. Після добової експозиції коринебактерій у дериват-вмісних фільтратах втрачається життєздатність тест-культури, за виключенням фільтратів культури біфідобактерій, вирощеної на власному «дезінтеграті». Після експозиції в зазначеному фільтраті тест-культури коринебактерій із найвищою густиною інокуляту (С) спостерігалася значне зменшення кількості життєздатних клітин у порівнянні з контролем.

Значущі відмінності між протимікробною активністю свіжоотриманих та розморожених зразків фільтратів спостерігалися також після двогодинної експозиції в них тест-культури *P. aeruginosa*. Кількісні показники життєздатності синьогнійної палички значуще вищі після двогодинної експозиції у розморожених фільтратах, ніж свіжоотриманих, і залежать від густини інокуляту. Фільтрати «дезінтегратів» біфідобактерій як свіжоотримані, так і розморожені, за умови добової експозиції проявляють по відношенню до тест-культури синьогнійної палички бактерицидний ефект незалежно від густини інокуляту. Добова експозиція *P. aeruginosa* у фільтраті культури біфідобактерій, вирощеної у власному «дезінтеграті», за умови застосування інокулятів А та В призводить до втрати життєздатності тест-культури, а за умови застосування інокуляту С – до значного зниження кількісних показників її життєздатності у порівнянні з контролем.

Протимікробна активність екзометаболітів бульйонних культур біфідобактерій по відношенню до тест-культур *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* ATCC 27853 досліджувалася Т.Х. Тимокхіною та А.А. Марковим зі співавт. [10, 18]. Порівняння результатів, отриманих зазначеними

culture were considerably higher after exposing them in frozen-thawed filtrates for two hours if compared with fresh ones and depended on the inoculate density. The filtrates of bifidobacterium 'disintegrate' both fresh and frozen-thawed manifested germ-kill effect to test-culture of *P. aeruginosa* during one-day exposure regardless of inoculate density. One day exposure of *P. aeruginosa* in filtrate of bifidobacteria culture, grown in its own 'disintegrate' when using inoculates A and B led to the loss of test-culture viability and during application of inoculate C it resulted in a considerable reduction of viability in comparison to the control.

Antimicrobial activity of exometabolites of bifidobacterium broth cultures in relation to test-cultures *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 was studied by T.Kh. Tymokhina, A.A. Markov *et al.* [13, 25]. The comparison of results obtained by the authors with the ones of our study showed that the filtrates of 'disintegrates' and bifidobacterium cultures both fresh and stored at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ were as good in antimicrobial activity as supernatants of 48 hour broth cultures and expressed higher antistaphylococcal activity if compared with supernatants of 72 and 96 hour broth culture of bifidobacteria. According to the viability indices of *P. aeruginosa* test-cultures after 24 hours exposure antimicrobial activity of obtained derivative-containing filtrates even after storage in a frozen state was found at the level of activity of supernatants of 48 hour broth culture of bifidobacteria. Quite a high level of antimicrobial activity of derivative-containing filtrates was demonstrated in relation to *S. epidermidis*, *C. xerosis*, *C. diphtheriae gravis* tox+ and *C. diphtheriae belfanti* tox+. The obtained results confirm the prospects of new metabiotics development based on structural and metabolite derivatives of bifidobacteria. It should be noted that when obtaining exometabolites of bifidobacteria from broth culture the final product contains nutrient substances of culture medium. Derivative-containing filtrates do not contain the elements of culture medium. Since they are infection-safe whereas the absence of the remains of nutrient medium of animal origin excludes the possibility for transmission of prion infections.

Conclusions

1. Comparative study using qualitative method of evaluation showed that antimicrobial activity of filtrates containing structural and metabolic derivatives of bifidobacteria after storage in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ was equal in fresh ones.

авторами, з даними нашого дослідження показало: фільтрати «дезінтегратив», та культур біфідобактерій, як свіжоотриманих так і тих, які зберігалися за температури $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$, за протимікробною активністю не поступаються супернатантам 48-годинних бульйонних культур та виявляють вищу протистафілококову активність порівняно зі супернатантами 72- та 96-годинних бульйонних культур біфідобактерій. За показниками життєздатності тест-культури сільногнійної палички після 24-годинної експозиції протимікробна активність отриманих розробленим нами способом дериват-вмісних фільтратів, навіть після зберігання у замороженому стані, виявилася на рівні активності супернатантів 48-годинних бульйонних культур біфідобактерій. Достатньо високий рівень протимікробної активності дериватвмісні фільтрати продемонстрували по відношенню до *S. epidermidis*, *C. xerosis*, *C. diphtheriae gravis* tox+ та *C. diphtheriae belfanti* tox+. Отримані в даному дослідженні результати підтверджують перспективність створення нових метабіотиків на основі структурних та метаболітичних дериватів біфідобактерій. Слід зазначити, що за умови отримання екзометаболітів біфідобактерій із бульйонних культур кінцевий продукт містить залишки середовища культивування. Дериват-вмісні фільтрати не містять елементи живильного середовища, а отже, є інфекційно безпечними. Відсутність у кінцевому продукті залишків живильного середовища тваринного походження виключає можливість передачі пріонних інфекцій.

Висновки

1. Порівняльне дослідження із застосуванням якісного методу оцінки показало, що фільтрати, які містять структурні та метаболітичні деривати біфідобактерій, після зберігання у замороженому стані при $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ за протимікробною активністю не поступаються свіжоотриманим.

2. Кількісний метод оцінки протимікробної активності підтвердив ефективність заморожування як способу збереження протимікробного потенціалу дериват-вмісних фільтратів і дозволив встановити, що двогодинна та добова експозиція у фільтрах після їхнього зберігання у замороженому стані призводить до втрати життєздатності або значного зниження кількісних показників збереженості тест-культур залежно від концентрації бактеріальних клітин в інокуляті та виду фільтрату. Різниця між кількісними показниками життєздатності тест-культур у свіжоотриманих та розморожених фільтрах статис-

2. Quantitative method of evaluation of antimicrobial activity confirmed the efficiency of freezing as a way of preservation of antimicrobial potential of derivative-containing filtrates and allowed to find that one-day and two-hour-long exposure in filtrates after storage in a frozen state led to the loss of viability or significant reduction in quantitative indices of test-culture viability depending on the concentration of bacterial cells in inoculate and filtrate type. The difference between quantitative indices of test-culture viability in fresh and frozen-thawed filtrates was statistically significant but made less than one order, *i. e.* 0.2–0.8 CFU/ml.

3. The method of storage in a frozen state at $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ allowed to maintain quite a high antimicrobial potential of derivative-containing filtrates, so it might be recommended for use both for scientific studies and commercial production.

References

1. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
2. Babinets OM. [Estimation of properties of probiotics immobilized on enterosorbents after low-temperature storage]. Bulletin of Problems in Biology and Medicine. 2012; (3): 48–53. Russian.
3. Beloborodova NV, Bairamov IT, Olenin AYU, Fedotcheva NI. [Exometabolites of some anaerobic microorganisms of human microflora]. Biomeditsinskaya Khimiya. 2011; 57(1): 95–105.
4. Chekhovich NI, Murashko AS, Titov LP. [Structural components of *Bifidobacterium bifidum* – as an activator of gene expression of immunocompetent cells]. In: Zhukova NP, editor. Collection of scientific papers of International Scientific-Practical Conference 'Health and Environment'; 2016 Oct 28, Minsk. Minsk: BSMU; 2016, Vol 2: p. 313–7. Russian.
5. Chernov N, Kapustyan A, Chernaya A. [The biologically active components obtaining from cell walls from polyspecific bacterial starter by enzymatic method]. In: Proc. of International Scientific and Technical Conference "State and Prospects of Food Science and Industry"; 2015 Oct 8–9, Ternopil. Ternopil: TNTU; 2015: p. 129–30. Russian.
6. Funk IA, Irkitova AA. [Biotechnological potential of bifidobacteria]. Acta Biologica Sibirica. 2016; 2(4): 67–79.
7. Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR. GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. BMC Immunol. 2010 Mar 24; 11: 15.
8. Kanner EV, Maksimov ML, Gorelova EA, Petrov VA. [Current approaches to correcting the intestinal microbiome in children during antibiotic therapy]. Meditsinskii Sovet. 2016; (1): 102–6. Russian.
9. Knysh OV, Isajenko OJu, Babych JeM, et al., inventors; Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. [Method for obtaining biologically active derivatives of bacteria of probiotic strains]. Patent of Ukraine N 122859. 2018 Jan 25. Ukrainian.
10. Kozlov IG, Andronova TM. [Effect of medicines via innate immunity receptors]. Allergology and Immunology. 2013; 14(4): 254–9. Russian.



тично значуща, але становить менше одного порядку – 0,2–0,8 lg КУО/мл.

3. Спосіб зберігання у замороженому стані за температури (-23 ± 1)°C дозволяє зберігати достатньо високий протимікробний потенціал дериват-вмісних фільтратів, тому може бути рекомендований до застосування як на етапах наукових досліджень, так і на виробництві.

Література

1. Бабинець ОМ. Оценка свойств пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, после низкотемпературного хранения. Вісник проблем біології і медицини. 2012; (3): 48–53.
2. Белобородова НВ, Байрамов ИТ, Оленин АЮ, Федотчева НИ. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека. Биомед. химия. 2011; 57(1): 95–105.
3. Высеканцев ИП, Бабинець ОМ, Марценюк ВФ, и др. Коррекция популяций ценобионтов *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. у мышей с экспериментальным дисбиозом кишечника после терапии иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися при -80 и -196°C . Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(3): 267–86.
4. Зотова ЕП, Трифанова ТИ. Влияние экзометаболитов лакто- и бифидобактерий на организм человека. Академический журнал западной Сибири. 2016; 12(5): 52–54.
5. Каннер ЕВ, Максимов МЛ, Горелова ЕА, Петров ВА. Современные подходы к коррекции микробиома кишечника у детей при проведении антибактериальной терапии. Медицинский Совет. 2016; (1): 102–6.
6. Книш ОВ, Ісаєнко ОЮ, Бабич ЄМ, та ін., винахідники; Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», патентовласник. Спосіб одержання біологічно активних дериватів бактерій пробіотичних штамів. Патент України на корисну модель №122859 2018 Січень 25.
7. Козлов ИГ, Андропова ТМ. Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета. Аллергология и иммунология. 2013; 14(4): 254–9.
8. Крылова ТВ, Несчисляев ВА, Чистохина ЛП. Пробиотическая активность метаболитных комплексов бифидобактерий. Вестник Урал. мед. академ. науки. 2011; (3/1): 85–6.
9. Ливинская ЕП, Коваленко НК, Гармашева И.Л. Дезинтеграция лактобацилл и энтерококков для получения фрагментов клеточных стенок. Мікробіологічний журнал. 2011; 73(3): 26–32.
10. Марков АА, Тимохина ТХ, Перунова НБ, Паромова ЯИ. Возможность применения экзометаболитов *Bifidobacterium bifidum* в травматологии и ортопедии для предотвращения первичной контаминации и биопленкообразования на поверхности имплантатов с синтетическим биоактивным кальций-фосфатным минеральным покрытием. Медицинский альманах. 2018; 54(3): 128–31.
11. Молохова ЕИ, Сорокина ЮВ. Разработки отечественных метаболитных пробиотиков и их стандартизация. Сиб. мед. журнал. 2011; 26(1): 29–33.
12. Несчисляев ВА, Мокин ПА, Федорова ТВ. К вопросу разработки высокоэффективных метаболитных пробиотиков. В: Широков ОН, редактор. Материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные направления научных исследований: от теории к практике»; 2016 Май 8, Чебоксары. Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс»; 2016, Т. 2: 15–7.
13. Несчисляев ВА, Столбова МГ, Лыско КА. Пробиотики на основе иммобилизованных лактобактерий: апробация пер-
11. Krylova TV, Neschislyayev VA, Chistokhina LP. [The probiotic activity of metabolic complexes of bifidobacteria]. Vestnik ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki. 2011; (3/1): 85–6. Russian.
12. Livinskaya EP, Kovalenko NK, Garmasheva IL. [Disintegration of Lactobacilli and Enterococci for obtaining cell wall fragments]. Mikrobiologichnyi Zhurnal. 2011; 73(3): 26–32. Russian.
13. Markov AA, Timokhina TKh, Perunova NB, Paromova Yal. [The possibility of using Bifidobacterium bifidum exometabolites in traumatology and orthopedics to prevent primary contamination and biofilm formation on the surface of implants with synthetic bioactive calcium-phosphate mineral coating]. Meditsinskij al'manah. 2018; 54(3): 128–31. Russian.
14. Martinez FC, Balciunas EM, Converti A, et al. Bacteriocin production by Bifidobacterium spp. A review. Biotechnol Adv. 2013 Jul-Aug; 31(4): 482–88.
15. Molokhova EI, Sorokina YuV. [Working out domestic metabolic probiotic and their standardization]. Sibirskii Meditsinskii Zhurnal. 2011; 26; 1(1): 29–33. Russian.
16. Montel Mendoza G, Pasteris SE, Otero MC, Fatima Nader-Macias ME. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage. J Appl Microbiol. 2014; 116(1): 157–66.
17. Neschislyayev VA, Mokin PA, Fedorova TV. [On the issue of development of highly effective metabolic probiotics]. In: Shirokov O.N., editor. Actual directions of scientific research: from theory to practice. Proceedings of the VIII International Scientific-Practical Conference; Cheboksary, May 8, 2016. Cheboksary: CNS «Interaktiv Plyus»; 2016; Vol. 2: 15–7. Russian.
18. Neschislyayev VA, Stolbova MG, Fedorova TV, Orlova VE. [Metabolic autoprobiotics]. Experimental and Clinical Gastroenterology Journal. 2015; (5): 103. Russian.
19. Neschislyayev VA, Stolbova MG, Lysko KA. [Probiotics based on immobilized lactobacilli: approbation of promising sorbents]. Experimental and Clinical Gastroenterology Journal. 2015; (5): 102–3. Russian.
20. Neschislyayev VA, Stolbova MG, Mokin PA, Bondarev VP. [Development of probiotic capsule dosage form with immobilized bifidobacteria]. Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie. 2013; 2(46): 35–8. Russian.
21. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis. 2009 Feb; 15(2): 300–310.
22. Ploskireva AA. [Metabolite therapy of disorders in microbioses of different biotopes in human organism]. Lechaschii Vrach Journal. 2016; 6: 21. Russian.
23. Shenderov BA. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. Microb Ecol Health Dis. [Internet]. 2013; [Cited 2018 Aug 21]; 24(1): 20399. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/mehd.v24i0.20399>.
24. Solovyeva IV, Tochilina AG, Belova IV, et al. [Construction of an immobilized form of the liquid probiotic]. Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod: Microbiology and Epidemiology. 2012; 2(3): 85–92. Russian.
25. Timokhina TKh, Markov AA, Paromova Yal, et al. [The way of receiving of bifidobacteria exometabolites with high antimicrobe activity]. Meditsinskaya Nauka i Obrazovaniye Urala 2016; 17 (2): 152–4. Russian.
26. Titov LP, Goncharov AE, Murashko AS, et al. [Interaction of bifidobacteria and their components with polynuclear and mononuclear human blood cells]. Proceedings of National Academy of Sciences of Belarus. Medical Series. 2013; (2): 10–18. Russian.
27. Vysekantsev IP, Babinets OM, Martsenyuk VF, et al. Correction of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. populations in mice with experimental intestinal dysbiosis after therapy with enterosorbent-immobilized probiotics stored at -80 and -196°C . Probl Cryobiol Cryomed 2015; 25(3): 267–86.



- спективных сорбентов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; (5): 102–3.
14. Несчисляев ВА, Столбова МГ, Мокин ПА, Бондарев ВП. Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2013; 46(2): 35–8.
 15. Несчисляев ВА, Столбова МГ, Федорова ТВ, Орлова ВЕ. Метаболитные аутопробиотики. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; (5): 103.
 16. Плоскирева АА. Метаболитная терапия нарушений микробиоценозов различных биотопов организма человека. Лечащий врач. 2016; 6: 21.
 17. Соловьева ИВ, Точилина АГ, Белова ИВ, и др. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика. Вестник Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского: Микробиология и эпидемиология. 2012; 2(3): 85–92.
 18. Тимохина ТХ, Марков АА, Паромова ЯИ, и др. Способ получения экзометаболитов бифидобактерий с высокой антимикробной активностью. Мед. наука и образование Урала. 2016; 17(2): 152–4.
 19. Титов ЛП, Гончаров АЕ, Мурашко АС, и др. Взаимодействие бифидобактерий и их компонентов с полинуклеарными и моноклеарными клетками крови человека. Весці НАН Беларусі. Сер. мед. наук. 2013; (2): 10–8.
 20. Функ ИА, Иркитова АН. Биотехнологический потенциал бифидобактерий. Acta Biologica Sibirica. 2016; 2(4): 67–79. doi: 10.14258/abs.v2i4.1634.
 21. Черно Н, Капустян А, Черная А. Получение биологически активных компонентов клеточных стенок поливидовой бактериальной закваски ферментативным способом: Тези доповідей міжнар. наук.-техн. конференції «Стан і перспективи харчової науки та промисловості», 2015 жовтня 8–9; Тернопіль. Тернопіль: ТНТУ; 2015: 129–30.
 22. Чехович НИ, Мурашко АС, Титов ЛП. Структурные компоненты *Bifidobacterium bifidum* – как активатор экспрессии генов иммунокомпетентных клеток. В: Жукова НП, редактор. Сб. науч. трудов Междунар. науч.-практ. конференции «Здоровье и окружающая среда»; 2016 Октябрь 28; Минск. Минск: БГМУ; 2016, Т. 2: 313–17.
 23. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
 24. Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR. GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. BMC Immunology. 2010; 11(1): 15.
 25. Martinez FC, Balciunas EM, Converti A, et al. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. Biotechnology Advances. 2013; 31(4): 482–8.
 26. Montel Mendoza G, Pasteris SE, Otero MC, Nader-Macias ME. Fatima. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage. Appl Microbiol. 2014; 116(1): 157–66.
 27. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis. 2009; 15(2): 300–10.
 28. Shenderov BA. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. Microb Ecol Health Dis [Internet]. 2013; [Cited 2018 Aug 21]; 24(1): 20399. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/mehd.v24i0.20399>.
 28. Zotova EP, Trifanova TI. [Effect of exometabolites of lacto- and bifidobacteria on the human body]. Academic Journal of Western Siberia. 2016; 12(5): 52–4. Russian.

