Probl Cryobiol Cryomed 2020; 30(4):343–358
https://doi.org/10.15407/cryo30.04.343
оригінальне дослідження research article

УДК 577.18.03/04:615.372

О.Ю. Ісаєнко

Збереження протимікробної активності метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii* після кріоконсервування

UDC 577.18.03/04:615.372

O.Yu. Isayenko

Post-Thaw Preservation of Anti-Microbial *Lactobacillus Rhamnosus* and *Saccharomyces Boulardii* Metabolite Complexes

Реферат: У роботі представлено протимікробний ефект метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii*, одержаних за авторською методикою, після 6-місячного зберігання в замороженому стані (−23 ± 1)ºС відносно *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemoliticus*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium xerosis* із множинною лікарською резистентністю. Доведено збільшення діаметрів зон затримки росту на ((3,0 ± 0,4)–(6,1 ± 0,3)) мм у всіх дослідних збудників під впливом метаболітних комплексів (свіжоотриманих та після зберігання) з азитроміцином та на ((6,1 ± 0,5)–(6,4 ± 0,3)) мм у *E. faecalis* із ампіциліном. Значущої різниці протимікробної активності антибактеріальних препаратів із свіжоотриманими комплексами та після їхнього зберігання при температурі (−23 ± 1)°С не встановлено. Доведено доцільність застосування обраного методу зберігання з метою конструювання препаратів нового покоління та розробки «препаратів супроводження» до антибіотиків.

Ключові слова: заморожений стан, зберігання, метаболіти, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, протимікробний ефект, антибіотики.

Abstract: The paper demonstrates an antimicrobial effect of metabolite complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*, obtained by own method, after 6 months' storage in a frozen state (−23 ± 1ºC) in respect of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemoliticus*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium xerosis* with multidrug resistance. Increase in diameters of growth inhibition zones (by (3.0 ± 0.4)–(6.1 ± 0.3) mm) for all the investigated pathogens under the influence of metabolite complexes (freshly obtained and after storage) with azithromycin has been proven. No significant difference in antimicrobial activity of antibacterial agents with freshly obtained complexes and after storage at (−23 ± 1)°C was found. The expediency of using the chosen storage method to design the brand new products as well as development of 'auxiliary drugs' for antibiotics was confirmed.

Key words: frozen state, storage, metabolites, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*, antimicrobial effect, antibiotics.

Світовою медичною проблемою є боротьба з антибіотикостійкими патогенними та умовно-патогенними збудниками інфекційних захворювань. Особливу загрозу представляють штами мікроорганізмів із резистентністю одночасно до декількох груп антибактеріальних препаратів та «нормальна» мікрофлора з набутою антибіотикостійкістю. Встановлено, що умовно-патогенні мікроорганізми з лікарською резистентністю до антибіотиків – резервуар полірезистентних штамів збудників інфекцій і основне джерело зараження інших людей [7].

Поширення стійких штамів мікроорганізмів та недостатня клінічна ефективність антибіотиків робить лікування пацієнтів безуспішним і спонукає до застосування альтернативних речовин, зокрема структурних компонентів і екзометаболітів пробіотиків, які здатні впливати

Fighting against antibiotic-resistant pathogenic and opportunistic pathogens of infectious diseases is medical task worldwide. A special threat is posed by strains of microorganisms having resistance to several groups of antibacterial drugs and 'normal' microflora with acquired antibiotic resistance. It has been established that opportunistic microorganisms with drug resistance to antibiotics are a reservoir of multidrug-resistant strains of infectious agents and the main source of infection for other people [11].

The spread of resistant strains of microorganisms and poor clinical efficiency of antibiotics makes the treatment of patients unsuccessful and encourages the use of alternative substances, in particular, structural components and exometabolites of probiotics, able to affect proliferative activity, adhesive properties, formation of biofilms and pathogens [1, 3, 18]. The use of metabolite-type drugs in clinical practice today is

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

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

Адреса для кореспонденції:
вул. Пушкінська, 14/16, м. Харків, Україна 61057;
тел.: (+38 057) 731-31-51, факс: (+38 057) 731-34-69
електронна пошта: el_isaenko@ukr.net

Address for correspondence:
14/16, Pushkinska str., Kharkiv, Ukraine 61057;
tel.:+380 57 731 3151, fax: +380 57 731 3469
e-mail: el_isaenko@ukr.net

Надійшла 15.05.2019
Прийнята до друку 09.11.2020

Received May, 15, 2019
Accepted November, 09, 2020

© 2020 O.Yu. Isayenko. 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.

на проліферативну активність, адгезивні властивості, утворення біоплівки та викликати гибель патогенних і полірезистентних умовно-патогенних мікроорганізмів [8, 10, 18]. Використання препаратів метаболітного типу в клінічній практиці на сьогодні обмежено через відсутність достатньої їхньої кількості на світовому фармацевтичному ринку. Це викликає необхідність створення та впровадження нових перспективних метаболітних засобів. Протимікробна активність продуктів життєдіяльності пробіотичних штамів щодо патогенних та умовно-патогенних збудників не викликає сумнівів: у науковій літературі останніх років постійно повідомляється про доцільність застосування метабіотиків при інфекційних захворюваннях різного ґенезу [3, 12, 14, 15]. З практичної точки зору принципово важливим залишається питання про оптимальні умови зберігання безклітинних препаратів. Вплив збереження біологічно активних (структурно-метаболітних) комплексів (БАК) *Lactobacillus rhamnosus* і *Saccharomyces boulardii* на протимікробну активність та ефективність їхньої спільної дії з антибактеріальними препаратами раніше не вивчався. Враховуючи попередні результати, в представленій роботі було досліджено антибактеріальний потенціал зразків після їхнього зберігання при помірно низькій температурі (–23 ± 1)ºС та вплив зазначеного температурного фактора на ефективність комбінованого застосування біологічно активних комплексів лактобактерій і сахароміцетів із антибактеріальними препаратами.

Мета роботи – вивчення протимікробної активності структурних компонентів і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* після зберігання за низької температури; оцінка їхньої ефективності при комбінованому застосуванні з антибактеріальними препаратами відносно полірезистентних мікроорганізмів для створення протимікробних засобів нового покоління та розробка «препаратів супроводження» до антибіотиків.

Матеріали і методи

У роботі використовували наступні культури пробіотичних мікроорганізмів: штам *L. rhamnosus* (LGG®) ATCC 53103, виділений із препарату «PREEMA®» («Schonen», Швейцарія); пробіотичні гриби *S. boulardii* CNCM I-745, одержані з препарату BULARDI® («Schonen»).

Із добових культур *L. rhamnosus* і *S. boulardii* готували суспензії мікроорганізмів у 0,9 %-му фізіологічному розчині натрію хлориду. Оптична щільність суспензій відповідала 10,0 одиниlimited because of the lack of sufficient quantities at the global pharmaceutical market. This necessitates the designing of new promising metabolites and their implementation. The antimicrobial activity of probiotic strains against pathogenic and opportunistic pathogens is beyond doubt: there are many recent published reports on the feasibility of using metabolites in infectious diseases of various origins [2, 5, 14, 15]. From a practical standpoint crucially important is the question of optimal storage conditions for cell-free drugs. The effect of storage of biologically active (structural-metabolite) complexes (BACs) of *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Saccharomyces boulardii*, on the antimicrobial activity as well as effectiveness of their joint action with antibacterial drugs has not been studied before. Taking into account the previous results, in this research an antibacterial potential of samples after storage at moderately low temperature (–23 ± 1)ºC as well as the influence of this temperature factor on the effectiveness of combined use of biologically active complexes of lactobacilli and saccharomyces with antibacterial drugs have been investigated.

The research was purposed to study the antimicrobial activity of structural components and metabolite complexes of *Lactobacillus rhamnosus GG* and *Saccharomyces boulardii* after storage at low temperatures, to assess their effectiveness during combined application with antibacterial drugs in respect of microrganisms to create antimicrobial products of new generation and to develop ‘accompanying drugs’ for antibiotics.

Materials and methods

The following cultures of probiotic microorganisms were used in the research: strain of *L. rhamnosus* (LGG®) ATCC 53103, isolated from the ‘PREEMA®’ drug (‘Schonen’, Switzerland); probiotic fungi *S. boulardii* CNCM I-745, derived from the BULARDI® drug (‘Schonen’).

Suspensions of microorganisms in 0.9% physiological sodium chloride solution were prepared from *L. rhamnosus* and *S. boulardii* daily cultures. The optical density of suspensions corresponded to 10.0 units on the McFarland scale (McF), which was measured using a Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic) according to the manufacturer’s instructions. Microbial cells of lactobacilli and saccharomyces were treated with low-frequency ultrasound with a frequency of $\Delta f\ 2 = 35–50$ kHz ($f_{max} = 40.0$ kHz) at an excitation amplitude U = 15 V with a load R = 50 Ω (P = 5 W) using a generator G3–109 (Velikoluksky Radio Plant, USSR). The conversion of electrical power to acoustic one $\eta \approx 5\%$ allows the achieving an

цям за шкалою McFarland (McF), яку вимірювали з використанням приладу «Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) згідно з інструкцією виробника. Мікробні клітини лактобактерій і сахароміцетів обробляли низькочастотним ультразвуком із частотою Δf 2 = 35–50 кГц (f_{max} = 40,0 кГц) при амплітуді збудження U = 15 В із навантаженням R = 50 Ω (P = 5 Вт) за допомогою генератора Г3–109 («Великолукський Радіозавод», СРСР). Коефіцієнт перетворення електричної потужності в акустичну ŋ ≈ 5% дозволяє досягти середньої потужності акустичних коливань у місці розташування біологічних об'єктів 0,25–0,5 Вт. Одержані після ультразвукової обробки суспензії *L. rhamnosus (L)* і *S. boulardii (S),* що містять структурні компоненти, використовували для культивування лактобактерій і грибів та вивчення протимікробної активності. Перед дослідженням проби центрифугували при 1000g впродовж 30 хв, а супернатант фільтрували через мембранні фільтри «Владіпор» типу МФАС-Б № 4 («Владіпор», Росія) із діаметром пор 0,2 мкм. Отже, вивчення протимікробної активності дослідних зразків відносно полірезистентних грампозитивних мікроорганізмів при окремому застосуванні та в комбінації з антибактеріальними препаратами проводили з рідиною, отриманою після фільтрування супернатанту.

Метаболіти лактобактерій (ML) та сахароміцетів (MS) одержували шляхом вирощування продуцента, оптична щільність якого відповідала 10,0 одиницям за шкалою McF, у попередньо опромінених ультразвуком суспензіях, що містять структурні компоненти таких самих мікроорганізмів. Зразки культивували при температурі (37 ± 1)ºС впродовж 72 годин, центрифугували і фільтрували [5]. Крім того, метаболіти отримували внесенням мікробних клітин сахароміцетів до оброблених ультразвуком лактобактерій (LS) або додаванням мікробних суспензій лактобактерій та сахароміцетів до попередньо опромінених *L. rhamnosus* (MLS) [4].

Заморожування зразків фільтратів здійснювали у морозильній камері холодильника «Samsung RB29FSRNDSA» («Samsung», Південна Корея). Проби зберігали при температурі (–23 ± 1)ºС протягом 6 місяців (термін спостереження). Зразки розморожували на водяній бані при температурі (37 ± 1)ºС.

Протимікробну дію фільтратів визначали після зберігання у вищезазначених умовах відносно тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemoliticus*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium xerosis*. Дослідження проводили на

average power of acoustic oscillations at the location of biological objects 0.25–0.5 Watts. Obtained after ultrasonic treatment, suspensions of *L. rhamnosus* (*L*) and *S. boulardii* (*S*) containing structural components were used to culture the lactobacilli and fungi as well as to study an antimicrobial activity. Before investigations the samples were centrifuged at 1,000 g for 30 min, and the supernatant was filtered through membrane filters 'Vladipor' of MFAS-B № 4 type (Vladipor, Russia) with a pore diameter of 0.2 μm. Therefore, antimicrobial activity of test samples against multidrug-resistant gram-positive microorganisms when used alone and in combination with antibacterial drugs was investigated with the liquid obtained after the supernatant filtration.

Metabolites of lactobacilli (ML) and saccharomyces (MS) were obtained by growing the producer, the optical density of which corresponded to 10.0 units on the McF scale, in pre-sonicated suspensions containing structural components of the same microorganisms. The samples were cultured at (37 ± 1)ºC for 72 hours, centrifuged and filtered [10]. In addition, the metabolites were prepared by introducing microbial saccharomyces cells into ultrasonically treated lactobacilli (LS) or by adding microbial suspensions of lactobacilli and saccharomyces to pre-irradiated *L. rhamnosus* (MLS) [9].

The filtrate samples were frozen in a freezer of the 'Samsung RB29FSRNDSA' refrigerator (Samsung, South Korea). Samples were stored at (–23 ± ± 1)ºC for 6 months (observation period) and were thawed in a water bath at (37 ± 1)ºC.

Antimicrobial effect of filtrates was determined after storage in the above conditions against *Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemoliticus, Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium xerosis* test strains. The studies were performed in gram-positive clinical isolates of *S. aureus, S. haemoliticus, E. faecalis* and *C. xerosis* with a multiple drug resistance (to levofloxacin, ceftriaxone, ciprofloxacin, doxycycline, ampicillin, *etc.*), stored in the collection of microorganisms of the Laboratory of the Airborne Infections Prevention at the SI 'Mechnikov Institute for Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine' (Kharkiv, Ukraine). For investigations the daily test cultures grown with regulated nutrient media were used [2]. Suspensions of microorganisms were prepared in 0.9% saline. The optical density of the samples corresponded to 1.0 and 0.5 units according to the McF scale (device 'Densi-La-Meter'). Suspensions of polyresistant microorganisms with a lower initial optical density (0.5 McF) were diluted 10 times as mentioned in the guidelines [13].

грампозитивних клінічних ізолятах *S. aureus, S. haemoliticus, E. faecalis* та *C. xerosis* із множинною лікарською резистентністю (до левофлоксацину, цефтріаксону, ципрофлоксацину, доксицикліну, ампіциліну тощо), які зберігаються в колекції мікроорганізмів лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків, Україна). Для дослідження використовували добові тест-культури, вирощені на регламентованих поживних середовищах [9]. Суспензії мікроорганізмів готували у 0,9 %-му фізіологічному розчині натрію хлориду. Оптична щільність проб відповідала 1,0 та 0,5 одиницям за шкалою McF (прилад «Densi-La-Meter»). Суспензії полірезистентних мікроорганізмів із меншою вихідною оптичною щільністю (0,5 за McF) розводили в 10 разів відповідно до методичних рекомендацій [1]. Синхронізацію тест-культур проводили в гіпотермічних умовах при (4 ± ± 1)ºС.

Для визначення протимікробної активності фільтратів до дослідних зразків, що містять структурні компоненти і метаболіти лактобактерій та сахароміцетів, додавали зависі тест-культур у співвідношенні 9:1. Контрольні проби містили тест-штами та фізіологічний розчин натрію хлориду у співвідношенні 1:9. Після двогодинної експозиції при (37 ± 1)ºС із дослідних та контрольних зразків готували послідовні розведення, з яких здійснювали висів 0,1 мл рідини на поверхню твердого живильного середовища. Через 24 години підраховували кількість колоній, що виросли, визначали кількість колоніє-утворюючих одиниць (КУО) в одиниці об'єму та виражали в десятковому логарифмі КУО/мл.

Спільну з антибіотиками ефективність фільтратів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* (до та після зберігання) відносно полірезистентних бактерій вивчали за допомогою модифікованого дискодифузійного методу, розробленого J. Sharma та співавт. [15–17].

На тверде поживне середовище робили посів суспензій тест-культур бактерій, інкубували при (37 ± 1)ºС впродовж 3 годин відповідно до методики J. Sharma та співавт. [16]. Підготовку дисків для визначення ефективності комбінованого застосування антибіотиків із фільтратами структурних компонентів і метаболітів лактобактерій та сахароміцетів проводили наступним чином. Стандартні диски з антибіотиками витримували в дослідних фільтратах протягом години при (37 ± 1)ºС для забезпечення максимального поглинання. В якості позитивного контролю The test cultures were synchronized under hypothermia at (4 ± 1)ºC.

To determine an antimicrobial activity of the filtrates to examine the samples containing structural components and metabolites of lactobacilli and saccharomyces, the test culture suspensions were added in a 9:1 ratio. Control samples contained test strains and physiological sodium chloride solution in 1:9 ratio. After two hours of exposure at (37 ± 1) ºC, serial dilutions were prepared from the experimental and control samples, of which 0.1 ml of liquid was plated on the solid nutrient medium surface. After 24 hours the number of colonies grown was counted, the one of colony forming units (CFU) per unit volume was determined and expressed in decimal logarithm of the CFU / ml.

The joint efficiency of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* filtrates (before and after storage) against multidrug-resistant bacteria was studied with antibiotics using a modified disco-diffusion method developed by J. Sharma *et al.* [15–17].

Bacterial test culture suspensions were inoculated on the solid nutrient medium and incubated at (37 ± 1)ºC for 3 hours according to the method of J. Sharma *et al.* [16]. The discs to determine the effectiveness of the combined use of antibiotics with filtrates of structural components and metabolites of lactobacilli and saccharomyces were prepared as follows. Standard discs with antibiotics were kept in the experimental filtrates for one hour at (37 ± 1)ºC to ensure maximum absorption. As a positive control a disc with antibiotics was used, and the one with sterile saline was a negative control. Experimental and control discs were applied to the solid culture medium with cultures of test strains of microorganisms, kept at (4 ± 1)ºC for one hour to ensure diffusion, incubated at (37 ± 1)ºC for 24 hours. Then the zone of microorganism growth inhibition was measured. Experimental discs with antibacterial drugs were compared with their controls.

The findings were statistically processed using the software 'Excel 2010' (Microsoft, USA). All the experiments were performed in 4–7 replicates, the mean values of the obtained indices, standard deviations and standard errors were determined. The significance of the difference between the obtained indices was established by t-test at $p < 0.05$.

Results and discussion

At the first stage of this research the influence of storage in a frozen state of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* biologically active complexes on their antibacterial properties was investigated. Filtrates containing structural components and metabolites

використовували диск із антибіотиками, негативного контролю – диск зі стерильним фізіологічним розчином натрію хлориду. На тверде поживне середовище з посівами тест-штамів мікроорганізмів наносили дослідні та контрольні диски, витримували при (4 ± 1)ºС протягом години для забезпечення дифузії, інкубували при (37 ± 1)ºС протягом 24 годин. Потім вимірювали зону інгібування росту мікроорганізму. Порівняння дослідних дисків із антибактеріальними препаратами проводили відносно контрольних.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програмного пакета «Excel 2010» («Microsoft», США). Всі досліди проводили в 4–7 повторах, визначали середні значення отриманих показників, середньоквадратичні відхилення та стандартні похибки. Значущість різниці між отриманими показниками встановлювали за допомогою t-тесту при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

На першому етапі роботи досліджували вплив зберігання в замороженому стані біологічно активних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* на їх антибактеріальні властивості. Фільтрати, що містять структурні компоненти та метаболіти лактобактерій і сахароміцетів, після 6-місячного зберігання в замороженому стані при (–23 ± 1)ºС проявили різний ступінь протимікробної активності відносно обраних полірезистентних мікроорганізмів (табл. 1).

Експозиція впродовж 2 годин тест-культур ентерококів та коринебактерій із густиною інокулятів 1,0 McF у всіх дослідних зразках супроводжувалася значним зниженням кількісного показника життєздатності бактерій у порівнянні з контролем, а за умови використання проб ML та MLS спостерігалася повна втрата життєздатності *C. xerosis*. Після застосування зазначених штамів із густиною інокуляту 0,5 McF, розведеного в 10 разів, встановлено повне (100%) інгібування збудників незалежно від структурно-метаболітних комплексів пробіотичного походження.

Ступінь ефективності впливу БАК *L. rhamnosus* та *S. boulardii* відносно тест-культур стафілококів залежить не лише від початкової густини інокуляту, а й від складу дослідних фільтратів (табл. 1). Втрата життєздатності резистентних культур *S. aureus* та *S. haemoliticus* із початковою густиною інокулятів 1,0 McF спостерігалася під впливом MS на 0,2–0,4 lg КУО/мл, а LS – на 0,8–2,3 lg КУО/мл у порівнянні з контролем

of lactobacilli and saccharomyces, after 6 months' storage in a frozen state at (–23 ± 1)ºC, showed various degrees of antimicrobial activity against selected polyresistant microorganisms (Table 1).

Exposure for 2 hours of the studied enterococci and corynebacteria cultures with an inoculum density of 1.0 McF in all test samples was accompanied by a significant decrease in quantitative viability of bacteria compared to the control, and when ML and MLS samples were used, there was a complete loss of viability of *C. xerosis*. After application of these strains with an inoculum density of 0.5 McF, diluted 10 times, the pathogens were completely (100%) inhibited, regardless of the structural and metabolic complexes of probiotic origin.

The degree of effectiveness of the *L. rhamnosus and S. boulardii* BACs against test cultures of staphylococci depends not only on the inoculum initial density, but also on the composition of experimental filtrates (Table 1). Loss of viability of *S. aureus* and *S. haemoliticus* resistant cultures with an initial inoculum density of 1.0 McF was observed under the influence of MS by 0.2–0.4 lg CFU / ml, and LS – by 0.8–2.3 lg CFU / ml compared with the control ($p < 0.05$). Quantitative indices of staphylococcal viability when using a suspension with a test culture concentration of 0.5 McF, diluted 10 times, in samples of metabolites of *S. boulardii* decreased by 0.5–2.7 lg CFU / ml. Bacteria were more sensitive to *L. rhamnosus* GG filtrates. After two hours of exposure to staphylococci in all samples of structural and metabolic complexes of lactobacilli, there was a loss of viability of test cultures when the inocula of 0.5 McF, diluted 10 times were used. There is an exception, namely the sample L, under the influence of which the quantitative viability of *S. aureus* compared with the control (4.0 lg CFU/ml) was significantly reduced. Strong differences in antimicrobial activity of *L. rhamnosus* filtrates were found with respect to multidrug-resistant cultures of *S. aureus* and *S. haemoliticus* with a concentration of 1.0 McF. Filtrates containing structural components and metabolites of lactobacilli reduced the quantitative indices of staphylococcal viability by 1.6–3.6 lg CFU/ml compared with the control ($p < 0.05$).

The presented research results on antimicrobial properties of filtrates of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* structural components and metabolites after storage in a frozen state at (–23 ± 1)ºC for 6 months indicate that the effectiveness depends not only on the inoculum initial density and composition of experimental samples, but also on an individual sensitivity of microorganisms. Different degrees of

Таблиця 1. Вплив фільтратів, які містять структурні компоненти та метаболіти *L. rhamnosus* і *S. boulardii*, після 6-місячного зберігання в замороженому стані при (–23 ± 1)ºС на життєздатність мікроорганізмів (*M* ± *SE*)

Table 1. Effect of filtrates containing structural components and metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, after 6 months' storage in frozen state at (–23 ± 1)°C on viability of microorganisms (*M* ± *SE*)

Тест-культура Cultures tested	Початкова каламутність суспензій тест-культур мікроорганізмів, за McF Initial opacity of microorganism cultures tested, on McF	Фільтрати, які містять структурні компоненти та метаболіти лактобактерій і сахароміцетів Filtrates containing structural components and metabolites of lactobacteria and saccharomyces						
		L	ML	MLS	S	MS	LS	Контроль Control
		Життєздатність мікроорганізмів, lg КУО/мл Viability of microorganisms, lg CFU/ml						
S. aureus	1,0	5,8 ± 0,09*	3,8 ± 0,2*	4,1 ± 0,1*	7,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	6,6 ± 0,1	7,4 ± 0,2
	0,05	2,3 ± 0,1*	0	0	6,1 ± 0,1	5,8 ± 0,2	5,3 ± 0,1*	6,3 ± 0,1
S. haemoliticus	1,0	4,35 ± 0,1*	4,25± 0,1*	4,37 ± 0,04*	7,37 ± 0,07	7,22 ± 0,1	5,17 ± 0,1*	7,47 ± 0,04
	0,05	0	0	0	6,15 ± 0,08	5,0 ± 0,1	3,55 ± 0,1*	6,26 ± 0,08
E. faecalis	1,0	4,7 ± 0,06*	4,4 ± 0,06*	4,9 ± 0,04*	4,8 ± 0,03*	4,7 ± 0,04*	4,7 ± 0,06*	8,5 ± 0,1
	0,05	0	0	0	0	0	0	7,3 ± 0,1
C. xerosis	1,0	3,2 ± 0,1*	0	0	4,4 ± 0,09*	4,3 ± 0,1*	4,1 ± 0,1*	7,4 ± 0,07
	0,05	0	0	0	0	0	0	6,4 ± 0,2

Примітки: Контроль – фізіологічний розчин натрію хлориду; 0 – відсутність росту мікроорганізму; * – відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Notes: Control – physiological saline; 0 – no microorganism growth; * – differences are significant relative to the control, $p < 0.05$.

($p < 0,05$). Кількісні показники життєздатності стафілококів при застосуванні суспензії з концентрацією тест-культур 0,5 McF, розведеної в 10 разів, у пробах метаболітів *S. boulardii* зменшувалися на 0,5–2,7 lg КУО/мл. Більшу чутливість бактерії проявили до фільтратів *L. rhamnosus* GG. Після двогодинної експозиції стафілококів у всіх зразках структурно-метаболітних комплексів лактобактерій спостерігалася втрата життєздатності тест-культур за умови застосування інокулятів 0,5 McF, розведених у 10 разів. Існує виключення – проба L, під впливом якої значно знижувалися кількісні показники життєздатності *S. aureus* порівняно з контролем (на 4,0 lg КУО/мл). Значущі відмінності протимікробної активності фільтратів *L. rhamnosus* встановлено відносно полірезистентних культур *S. aureus* та *S. haemo-*

bacteria sensitivity to experimental samples have been established, that coincides with previously obtained data on pathogenic corynebacteria [6].

At the second stage of research the effectiveness of a combined use of structural-metabolic complexes with antibiotics against gram-positive multi drug-resistant pathogens was studied. These investigations were performed in antibacterial drugs, to which it was recommended to primarily determine the sensitivity of microorganisms [13]. Such drugs for *Staphylococcus* include macrolides and fluoroquinolones (azithromycin and levofloxacin), which are first-line medications and used to treat staphylococcal infections. By the effect mechanism they belong to one group, but differ in the following: macrolides inhibit protein synthesis at the level of ribosomes, and quinolones impede the synthesis of bacterial DNA. The synergistic

liticus із концентрацією 1,0 McF. Фільтрати, що містять структурні компоненти та метаболіти лактобактерій, зменшували кількісні показники життєздатності стафілококів на 1,6–3,6 lg КУО/мл порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Представлені в даній роботі результати дослідження протимікробних властивостей фільтратів структурних компонентів та метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* після зберігання в замороженому стані при (–23 ± 1)ºС протягом 6 місяців свідчать про те, що ефективність залежить не лише від початкової густини інокуляту та складу дослідних проб, а і від індивідуальної чутливості мікроорганізмів. Встановлено різний ступінь чутливості бактерій до експериментальних зразків, який співпадає з попередньо отриманими даними відносно патогенних коринебактерій [6].

На другому етапі роботи вивчали ефективність поєднаного застосування структурно-метаболітних комплексів із антибіотиками щодо грампозитивних полірезистентних збудників. Ці дослідження проводилися на антибактеріальних лікарських засобах, до яких рекомендують в першу чергу визначати чутливість мікроорганізмів [1]. До таких препаратів щодо представників *Staphylococcus* відносяться макроліди і фторхінолони (азитроміцин та левофлоксацин), які є препаратами першого ряду і використовуються для лікування стафілококових інфекцій. Ці лікарські засоби за механізмом дії відносяться до однієї групи, але відрізняються наступним: макроліди інгібують синтез білка на рівні рибосом, а хінолони – синтез бактеріальної ДНК. Синергічна взаємодія протимікробних засобів і структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* відносно полірезистентних стафілококів подібна до такої за окремого застосування антибактеріальних препаратів (рис. 1, табл. 2).

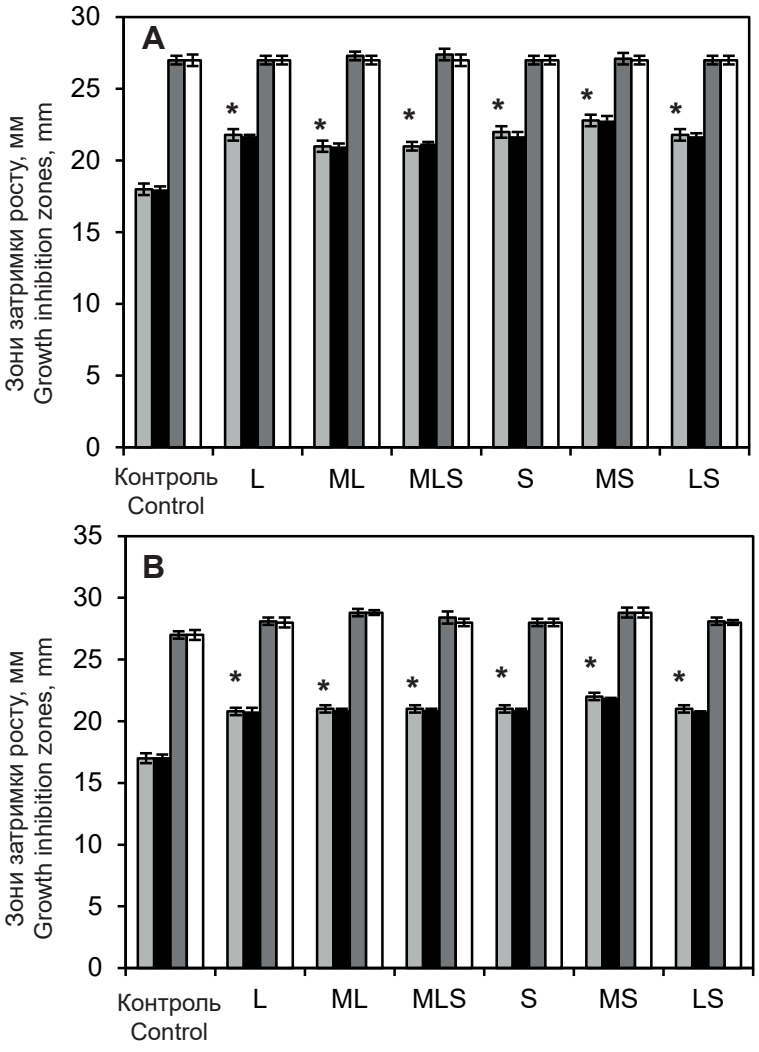

Рис. 1. Зони затримки росту грампозитивних полірезистентних мікроорганізмів *S. aureus* (**A**) і *S. haemoliticus* (**B**) після комбінованого застосування азитроміцину (■, ■) левофлоксацину (□, ■) із фільтратами, що містять структурні компоненти та метаболіти *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, які зберігалися в замороженому стані при (–23 ± 1)ºС (■, □) та свіжоотримані (■, ■); * – різниця значуща відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Zones of growth inhibition of gram-positive polyresistant microorganisms *S. aureus* (**A**) and *S. haemoliticus* (**B**) after combined use of azithromycin (■, ■) levofloxacin (□, ■) with filtrates containing structural components and metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, which were stored in frozen state at (–23 ± 1)°C (■, □) and freshly obtained ones (■, ■); * – differences are significant relative to the control, $p < 0.05$.

Протимікробна поєднана дія азитроміцину із структурними компонентами та метаболітами лактобактерій і сахароміцетів була однакова у обох представників *Staphylococcus*. Спільне застосування даного антибіотика та дослідних речовин відносно *S. aureus* супроводжувалося

interaction of antimicrobial agents and structural-metabolic complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* with respect to multidrug-resistant staphylococci is similar to that with a single use of antibacterial drugs (Fig. 1, Table 2).

Antimicrobial combined effect of azithromycin with the structural components and metabolites of lactobacilli and saccharomyces was the same for both *Staphylococcus* types. Co-administration of this antibiotic and test substances with respect to *S. aureus* was accompanied by an increase in their

Таблиця 2. Зміни зон пригнічення росту та чутливості *Staphylococcus* після поєднаного застосування антибактеріальних препаратів із фільтратами, що містять структурні компоненти та метаболіти *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, після 6-місячного зберігання при (–23 ± 1)ºС, *n* = 7

Table 2. Changes in zones of growth inhibition and sensitivity of *Staphylococcus* after combined use of antibacterial drugs with filtrates containing structural components and metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, after 6 months' storage at (–23 ± 1)°C, *n* = 7

Препарати Medications	Показники Parameters	Структурно-метаболітні речовини Structural and metabolic substances					
		L	ML	MLS	S	MS	LS
		S. aureus					
Левофлоксацин Levofloxacin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	0	0	0	0	0	0
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s
Азитроміцин Azithromycin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	+3,8	+3,0	+3,0	+3,8	+4,8	+3,8
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s
		S. haemoliticus					
Левофлоксацин Levofloxacin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	+1,0	+1,8	+1,0	+1,0	+1,8	+1,0
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s
Азитроміцин Azithromycin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	+3,8	+3,8	+3,8	+3,8	+4,8	+3,8
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s

Примітки: Контроль – фізіологічний розчин натрію хлориду; 0 – відсутність росту мікроорганізму; * – відмінності значущі відносно контролю; ч – чутливий, п – помірно-стійкий; $p < 0,05$.

Notes: Control – physiological saline; 0 – no changes in the zones of microorganism growth inhibition; s – sensitive, i – intermediate resistant; * – differences are significant relative to the control, $p < 0.05$.

підвищенням їхньої протимікробної активності незалежно від використаної комбінації (3,0 ± 0,4)–(4,8 ± 0,3) мм (свіжовиділені) та (3,0 ± 0,2)–(4,8 ± 0,2) мм (після зберігання). Помірно-стійкий до азитроміцину *S. haemoliticus* проявив чутливість до комбінованого застосування антибактеріального препарату із структурно-метаболітними комплексами. Максимальна зона посилення (4,8 ± 0,3) мм у свіжоотриманих та

antimicrobial activity regardless of the combination used (3.0 ± 0.4)–(4.8 ± 0.3) mm (fresh) and (3.0 ± ± 0.2)–(4.8 ± 0.2) mm (after storage). Moderately resistant to azithromycin *S. haemolyticus* was sensitive to the combined use of an antibacterial drug with structural-metabolic complexes. The maximum gain zone (4.8 ± 0.3) mm in freshly obtained and (4.8 ± 0.1) mm after storage was noted in combination with MS.

(4,8 ± 0,1) мм після зберігання встановлена у поєднанні з MS.

Збільшення протимікробної активності при комбінації структурних компонентів та метаболітів пробіотичних штамів із левофлоксацином проти *S. aureus* не спостерігалося. Тенденція до посилення ефекту встановлена за умов спільного застосування левофлоксацину з дослідними зразками лактобактерій і сахароміцетів відносно *S. haemoliticus*. Найбільше підвищення синергічної протимікробної дії відбувалося для комбінації левофлоксацину з ML та MS на (1,8 ± 0,5) мм – свіжовиділені та (1,8 ± 0,2) мм – після зберігання.

Для представників *Enterococcus* левофлоксацин та ампіцилін є препаратами першого ряду, які застосовуються для лікування ентерококових інфекцій. Вони відносяться до різних груп та відрізняються за механізмом дії: β-лактами (ампіцилін) інгібують синтез клітинної стінки мікроорганізму. Оцінка умов зберігання структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* на протимікробний ефект із зазначеними антибіотиками показала різні результати (рис. 2, табл. 3).

Після спільного застосування β-лактамного препарату (ампіциліну) із метаболітними комплексами спостерігалося посилення їхньої протимікробної дії відносно резистентного штаму *E. faecalis*. Для більшості проб підвищення відбувалося з (11,1 ± 0,3) до (17,4 ± 0,3) мм (свіжовиділені) та (11,0 ± 0,3) до (17,1 ± 0,2) мм (після зберігання). Поєднання ампіциліну з MS показало максимальне збільшення зон затримки росту ентерококу до (17,5 ± 0,4) мм (свіжоотримані) та (17,3 ± 0,2) мм (після зберігання). Помірно-стійкий до ампіциліну ентерокок проявляв чутливість до комбінованої дії всіх дослідних речовин із зазначеним антибіотиком ($p < 0,05$) (табл. 3). При порівнянні дії БАК до і після заморожування та зберігання за температури (–23 ± 1)ºС відмінностей не встановлено.

Для *Corynebacterium* до протимікробних засобів, що мають клінічне призначення, відно-

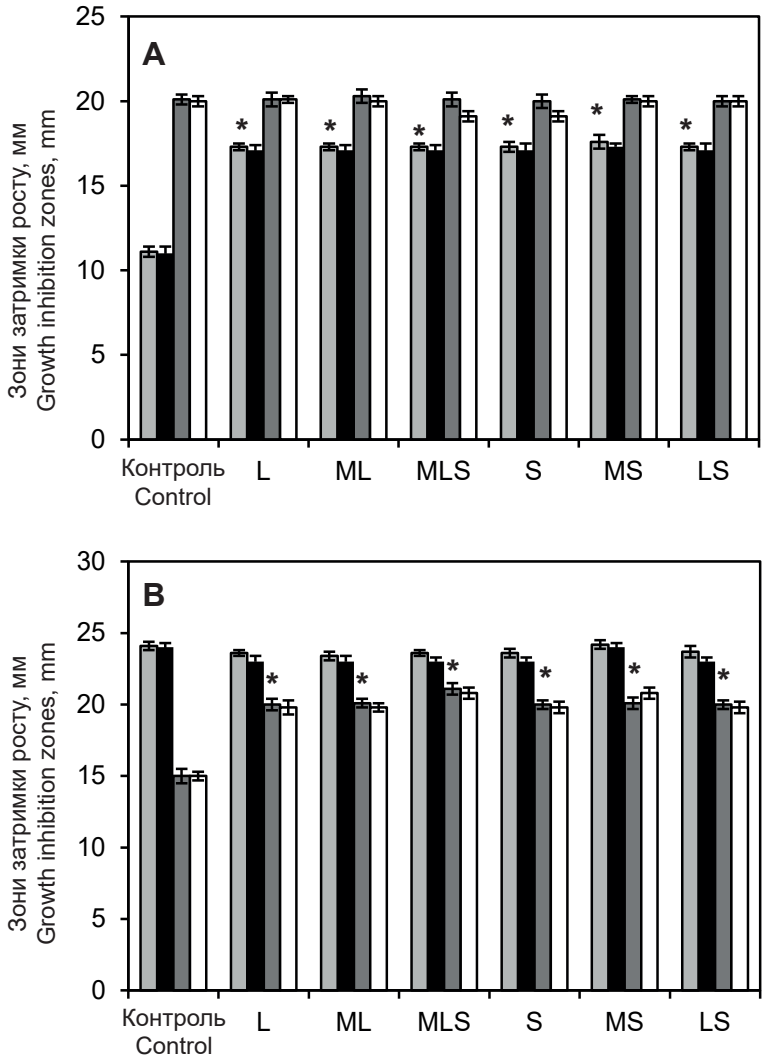

Рис. 2. Зони затримки росту грампозитивних полірезистентних мікроорганізмів *E. faecalis* (**A**) і *C. xerosis* (**B**) після комбінованого застосування ампіциліну (■, ■) та левофлоксацину (□, ■) відносно ентерококу або азитроміцину (□, ■) відносно коринебактерій із фільтратами, що містять структурні компоненти та метаболіти *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, які зберігалися в замороженому стані при (–23 ± 1)ºС (■, □) та свіжоотримані (■, ■); * – різниця значуща відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Zones of growth inhibition of gram-positive poly-resistant microorganisms of *E. faecalis* (**A**) and *C. xerosis* (**B**) after combined use of ampicillin (■, ■) and levofloxacin (□, ■) *versus* enterococci or azithromycin (□, ■) *versus* corynebacteria with filtrates containing structural components and metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, which were stored in frozen state at (–23 ± 1)°C (■, □) and freshly obtained ones (■, ■); * – differences are significant relative to the control; $p < 0.05$.

No increase in antimicrobial activity in combination of structural components and metabolites of probiotic strains with levofloxacin against *S. aureus* was observed. The tendency to increase the effect was established under the conditions of joint use of levofloxacin with experimental samples of lactobacilli and saccharomycetes against *S. haemolyticus*. The largest rise in synergistic antimicrobial activity occurred if there was used a combination of

Таблиця 3. Зміни зон пригнічення росту та чутливості *E. faecalis* і *C. xerosis* після поєднаного застосування антибактеріальних препаратів із фільтратами, що містять структурні компоненти та метаболіти *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, після 6-місячного зберігання при (–23 ± 1)ºС, *n* = 7

Table 3. Changes in zones of growth inhibition and sensitivity of *E. faecalis* and *C. xerosis* after combined use of antibacterial drugs with filtrates containing structural components and metabolites of *L. rhamnosus* and *S. boulardii*, after 6 months of storage at (–23 ± 1)ºС, *n* = 7

Препарати Medications	Показники Parameters	Структурно-метаболітні речовини Structural and metabolic substances					
		L	ML	MLS	S	MS	LS
E. faecalis							
Левофлоксацин Levofloxacin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	0	0	–0,8	–0,8	0	0
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s
Ампіцилін Ampicillin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	6,1	6,1	6,1	6,1	6,3	6,1
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s
C. xerosis							
Ампіцилін Ampicillin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	–1	–1	–1	–1	0	–1
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s	ч/ч s/s
Азитроміцин Azithromycin	Зміни зони росту, мм Changes of growth zone, mm	4,8	4,8	5,8	4,8	5,8	4,8
	Чутливість (до/після) Sensitive (before/after)	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s	п/ч i/s

Примітки: Контроль – фізіологічний розчин натрію хлориду; 0 – відсутність росту мікроорганізму; * – відмінності значущі відносно контролю; ч – чутливий, п – помірно-стійкий; $p < 0,05$.

Notes: Control – physiological saline; 0 – no changes in the zones of microorganism growth inhibition; s – sensitive, i – intermediate resistant; * – differences are significant relative to the control, $p < 0.05$.

сяться препарати першого ряду – ампіцилін та азитроміцин. Після спільного застосування всіх структурно-метаболітних комплексів із азитроміцином спостерігалося збільшення зон інгібування росту полірезистентного штаму коринебактерій на (5,0 ± 0,5) – (6,1 ± 0,3) мм (свіжоотримані) та (4,8 ± ± 0,2) – (5,8 ± 0,2) мм (після зберігання), що аналогічно результатам комбінованої дії дослідних речовин із зазlevofloxacin with ML and MS by (1.8 ± 0.5) mm for freshly isolated and (1.8 ± 0.2) mm after storage.

For Enterococcus, levofloxacin and ampicillin are first-line drugs used to treat enterococcal infections. They belong to various groups and differ in the mechanism of action: β-lactams (ampicillin) inhibit the synthesis of the microorganism cell wall. Evaluation of storage conditions of *L. rham-*

наченим антибіотиком відносно стафілококів. Максимальне підвищення протимікробної активності відмічено під впливом зразків MLS та MS із азитроміцином на (6,1 ± 0,3) мм до зберігання та (5,8 ± 0,2) мм після зберігання.

Значущої різниці впливу ампіциліну окремо або спільно із структурно-метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів не відмічено: діаметр зони затримки росту полірезистентного штаму *Corynebacterium* залишався незмінним або спостерігалося незначне зниження зони інгібування (рис. 2, табл. 3). Отже, комбіноване застосування дослідних речовин із ампіциліном або азитроміцином показало протилежні результати.

Отримані результати комбінованого застосування азитроміцину з БАК (за авторською методикою), що зберігалися тривалий час при температурі (–23 ± 1)°С, показали посилення їхньої протимікробної дії відносно всіх дослідних полірезистентних грампозитивних мікроорганізмів (у 100 % зразків) на 3,0–5,8 мм (див. рис. 1, 2, табл. 2, 3).

Дані, представлені у табл. 2 та 3, показують, що після комбінованого застосування фільтратів лактобактерій і сахароміцетів із левофлоксацином відносно двох представників *Staphylococcus* та одного *Enterococcus* протимікробна активність не підвищувалася в 55,6 % зразків, зона затримки росту мікроорганізмів зменшувалася на 0,8 мм у 11,1 %, а тенденція до посилення на 1,8 мм відмічалася у 33,3 %.

При комбінованому застосуванні БАК із фторхінолонами (левофлоксацином), який інгібують синтез бактеріальної ДНК, ефективність відсутня, але виявлено посилення протимікробної дії (100 %) з макролідами (азитроміцином), що інгібують синтез білка на рівні рибосом. Враховуючи цей факт, можна припустити, що результат синергічної взаємодії антибіотиків і структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* залежить від механізму дії протимікробного лікарського засобу. Але при спільному застосуванні β-лактамного препарату (ампіциліну), який за механізмом дії інгібує синтез клітинної стінки мікроорганізмів, з БАК нами отримано протилежні дані. Посилення їхньої протимікробної дії спостерігалося відносно полірезистентного штаму *E. faecalis* (на 6,1–6,3 мм) у 100 % зразків, при цьому збільшення зон затримки росту стійкого збудника *C. xerosis* не встановлено. Отже, підвищення активності відбувалося під впливом антибактеріальних препаратів із різними БАК та, ймовірно, залежало від чутливості

nosus and *S. boulardii* structural-metabolic complexes on the antimicrobial effect with these antibiotics yielded different results (Fig. 2, Table 3).

After co-administration of β-lactam drug (ampicillin) with metabolic complexes, an increase in their antimicrobial activity against a resistant strain of *E. faecalis* was observed. For most samples, the rise occurred from (11.1 ± 0.3) to (17.4 ± ± 0.3) mm (fresh) and (11.0 ± 0.3) to (17.1 ± 0.2) mm (after storage). The combination of ampicillin with MS showed a maximum increase in enterococcal growth inhibition zones to (17.5 ± 0.4) mm (freshly obtained) and (17.3 ± 0.2) mm (after storage). Moderately resistant to ampicillin enterococci were sensitive to the combined action of all test substances with the specified antibiotic ($p < 0.05$) (Table 3). When comparing the effect of BACs before and after freezing as well as storage at a temperature of (–23 ± 1)ºC no differences were found.

For *Corynebacterium*, first-line antimicrobials applied in clinic include ampicillin and azithromycin. After the joint use of all structural-metabolic complexes with azithromycin, there was an increase in the zones of growth inhibition of the corynebacteria multidrug-resistant strain by (5.0 ± 0.5)–(6.1 ± 0.3) mm (freshly obtained) and (4.8 ± 0.2)–(5.8 ± 0.2) mm (after storage), which was similar to the results of the combined action of test substances with the specified antibiotic against staphylococci. The maximum rise in antimicrobial activity was observed under the influence of MLS and MS samples with azithromycin by (6.1 ± 0.3) mm before storage and (5.8 ± ± 0.2) mm after storage.

Significant difference in the effect of ampicillin alone or together with the structural-metabolic complexes of lactobacilli and saccharomyces was not observed: the diameter of the growth inhibition zone of the *Corynebacterium* multidrug-resistant strain remained unchanged or there was a slight decrease in the inhibition zone (Fig. 2, Table 3). Therefore, the combined use of test substances with ampicillin or azithromycin showed opposite results.

The results of the combined use of azithromycin with BACs (according to the author's method), stored for a long time at (–23 ± 1)ºC, showed an increase in their antimicrobial action against all experimental polyresistant gram-positive microorganisms (in 100% of samples) by 3.0–5.8 mm (see Figs. 1, 2, Tables 2, 3) .

The data presented in Tables 2 and 3, demonstrate that after the combined use of lactobacilli and saccharomyces filtrates with levofloxacin against

штаму тест-культури до дослідних комбінацій БАК із антибіотиками. Максимальне збільшення пригнічення росту мікроорганізмів встановлено при спільному застосуванні фільтрату метаболітів сахароміцетів (MS) із азитроміцином або ампіциліном на 4,8–6,3 мм, за виключенням полірезистентного штаму коринебактерій: при комбінованому застосуванні з ампіциліном зони затримки росту не змінювалися.

Отримані результати добре узгоджуються з даними досліджень інших авторів [15–17]. Відоме посилення протимікробної активності антибіотиків (азтреонаму, амікацину, меропенему, ципрофлоксацину) пробіотичними штамами *L. rhamnosus*, *S. boulardii*, *S. faecalis* і *L. acidophilus* щодо референтних та циркулюючих штамів *P. aeruginosa* у 71,87 % дослідних зразків [16]. Встановлено підвищення протимікробної активності амоксициліну/клавуланату у поєднанні з пробіотиками *S. boulardii* та *L. rhamnosus* на 10 мм проти *E. coli* [15]. Відмічено збільшення зон інгібування росту *S. aureus* у 84,37 % проб, відсутність змін – у 12,5 % та зменшення – у 3,12 % зразків антибіотиками (амоксициліном/клавуланатом, азитроміцином, ципрофлоксацином) у поєднанні з зазначеними вище пробіотичними мікроорганізмами (*L. rhamnosus, S. boulardii, S. faecalis і L. acidophilus*) [17].

Результати індивідуальної чутливості мікроорганізмів до різних комбінацій БАК із антибіотиками співпадають із даними D. Field та співавт. [12], які встановили підвищення протипсевдомонадної активності колістину, поліміксину В нізином – поліпептидним антибіотиком, утвореним *Lactococcus lactis*. У інших роботах при комбінованому застосуванні нізину з ципрофлоксацином спостерігався протимікробний ефект відносно трьох із п'яти ізолятів стійких (MRSA) та сприйнятливих (MSSA) до метициліну *S. aureus*, а синергічну взаємодію нізину – ванкоміцину встановлено до двох із п'яти штамів стафілококів [11].

У наступних роботах авторами описані механізми синергічного ефекту традиційних протимікробних засобів та біологічно активних речовин. Так, молекули-потенціатори завдяки руйнуванню негативно заряджених зовнішніх мембран резистентних грамнегативних мікроорганізмів дозволяють проникати іншим непроникним молекулам, зокрема антибактеріальним препаратам [20]. Комбінування поліміксину В та граміцидину S, утвореного *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*), відкрило нові молекулярні мішені в мембрані та перешкоджає

two representatives of *Staphylococcus* and one *Enterococcus* the antimicrobial activity did not increase in 55.6% of samples, the zone of growth inhibition of microorganisms decreased by 0.8 mm in 11.1%, and the tendency to increase by 1.8 mm was observed in 33.3%.

When BACs are used jointly with fluoroquinolones (levofloxacin), which inhibits bacterial DNA synthesis, there is no efficacy, but there is a rise in antimicrobial activity (100%) with macrolides (azithromycin), which inhibits protein synthesis at the ribosome level. Assuming this fact, we can suppose that the result of the synergistic interaction of antibiotics and structural-metabolic complexes of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* depends on the antimicrobial drug effect mechanism. However with the joint use of β-lactam drug (ampicillin), which due to its mechanism of action inhibits the synthesis of cell wall of microorganisms, we obtained the opposite data with BACs. An increase in their antimicrobial action was observed relative to the multidrug-resistant strain of *E. faecalis* (by 6.1–6.3 mm) in 100% of the samples, with no rise in the zones of growth inhibition of the *C. xerosis* resistant pathogen. Thus, the enhanced activity was observed under the influence of antibacterial drugs with different BACs and probably depended on the sensitivity of the test culture strain to experimental combinations of BACs with antibiotics. The maximum increase in growth inhibition of microorganisms was found when the filtrate of saccharomyces metabolites (MS) was co-administered with azithromycin or ampicillin by 4.8–6.3 mm, except for the corynebacteria multidrug-resistant strain: when combined with ampicillin, growth inhibition zones did not change.

The findings are aligned with the data reported by other authors [15–17]. An increase in antimicrobial activity of antibiotics (aztreonam, amikacin, meropenem, ciprofloxacin) by probiotic strains of *L. rhamnosus, S. boulardii, S. faecalis* and *L. acidophilus* relative to reference and circulating strains of *P. aeruginosa* is known in 71.87% of the studied samples [16]. There was found a rise in antimicrobial activity of amoxicillin / clavulanate in combination with *S. boulardii* and *L. rhamnosus* probiotics by 10 mm against *E. coli* [15]. There was an increase in zones of *S. aureus* growth inhibition in 84.37% of samples, no changes were found in 12.5% and a decrease was revealed in 3.12% of samples with antibiotics (amoxicillin / clavulanate, azithromycin, ciprofloxacin) in combination with the above probiotic microorganisms (*L. rhamnosus, S. boulardii, S. faecalis* and *L. acidophilus*) [17].

зв'язуванню лігандів на гідрофобній поверхні ферментів [13]. Встановлено потенціювання пеніциліну, ампіциліну, гентаміцину, канаміцину, рокситроміцину, стрептоміцину, ванкоміцину, хлорамфеніколу, цефуроксиму, цефазоліну, цефтріаксону, цефепіму, ципрофлоксацину, іміпенему і лінезоліду нізином. Найкращий синергічний ефект відносно трьох штамів *E. faecalis* мала комбінація нізину і пеніциліну або хлорамфеніколу. За допомогою просвічуючого електронного мікроскопа встановлено, що *E. faecalis* був порушений будь-яким антибіотиком у поєднанні з нізином [19].

Експериментальне вивчення збереження біологічно активних речовин мікробного походження має важливе значення для науково-дослідницьких цілей та промислових підприємств. Вагомість зазначених досліджень підкріплюється обмеженістю в доступній літературі даних щодо оптимальних умов зберігання безклітинних пробіотичних препаратів. У попередніх наших роботах досліджено протимікробну активність фільтратів бульйонних культур пробіотиків із різними посівними дозами одразу після отримання та зберігання протягом 60 діб у рідкому стані за температури (4 ± 1)°C, у замороженому стані при (–23 ± 1)°C та ліофілізованому стані за гіпотермічних умов ((4 ± 1)°C) [2]. Встановлено, що зазначені різні умови збереження фільтратів культуральних рідин пробіотиків впродовж 60 діб суттєво не знижують їх протимікробну активність. Збільшення терміну зберігання при температурі (4 ± 1)°C з 60 діб до 6 місяців негативно впливало на збереження протибіоплівкових властивостей структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* відносно формування біоплівок токсигенними представниками *Corynebacterium*. Проте, при зберіганні БАК *L. rhamnosus* і *S. boulardii* за температури (–23 ± 1)ºC впродовж 6 місяців їх вихідна пригнічуюча активність щодо утворення біоплівок токсигенними представниками *Corynebacterium* не змінюється. Представлені результати збереження синергічної активності структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* з антибактеріальними препаратами відносно полірезистентних збудників при зберіганні у замороженому стані при (–23 ± 1)°C доповнюють дані попередніх власних досліджень. До переваг нашого способу заморожування порівняно з іншими методами зберігання слід віднести простоту, доступність та надійність. Отже, представлені в даній роботі результати підтверджують доцільність зберігання у замороженому стані метабіотиків на етапах наукових

The results of individual sensitivity of microorganisms to different combinations of BACs with antibiotics coincide with the data of D. Field *et al.*, who revealed an increase in antipseudomonas activity of colistin, polymyxin B nisin, which is a polypeptide antibiotic formed by *Lactococcus lactis* [5]. In other investigations, the combined use of nisin with ciprofloxacin had an antimicrobial effect on three of the five isolates, resistant (MRSA) and susceptible (MSSA) to methicillin *S. aureus*, and a synergistic nisin – vancomycin interaction was found in two of the five strains of staphylococcus [4].

In the following reports, the authors describe the mechanisms of synergistic effect of traditional antimicrobials and biologically active substances. Thus, potentiating molecules due to the destruction of negatively charged outer membranes of resistant gram-negative microorganisms allow the penetration of other impermeable molecules, in particular antibacterial drugs [20]. The combination of polymyxin B and gramicidin S, formed by *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*), has opened new molecular targets in membrane and inhibits the binding of ligands on hydrophobic surface of enzymes [12]. Potentiation of penicillin, ampicillin, gentamicin, kanamycin, roxithromycin, streptomycin, vancomycin, chloramphenicol, cefuroxime, cefazolin, ceftriaxone, cefepime, ciprofloxacin, imipenem and linezolid has been established. The best synergistic effect for the three strains of *E. faecalis* was provided by a combination of nisin and penicillin or chloramphenicol. By means of transmission electron microscope *E. faecalis* was found to be disturbed by any antibiotic in combination with nisin [19].

Experimental study of the preservation of biologically active substances of microbial origin for research purposes as well as for industrial enterprises is important. The value of these studies is supported by the limited data in available publications on the optimal storage conditions for cell-free probiotic drugs. In our previous works, the antimicrobial activity of probiotic broth culture filtrates with different plating doses immediately after obtaining and storage for 60 days in liquid state at a temperature of (4 ± 1)°C, in a frozen state at (–23 ± 1)°C and lyophilized state under hypothermic conditions ((4 ± 1)°C) was investigated [7]. These different storage conditions for the filtrates of probiotic culture fluids for 60 days were found not significantly to reduce their antimicrobial activity. Prolongation of the shelf life at a temperature of (4 ± 1)°C from 60 days to 6 months negatively affected the preservation of the antifilm properties of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* struc-

досліджень і виробництва при створенні протимікробних засобів, а також для розробки «препаратів супроводження» до антибіотиків.

Висновки

1. Комбіноване застосування структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii*, які зберігалися тривалий час у замороженому стані (–23 ± 1)ºС та свіжоотриманих, із левофлоксацином відносно двох представників *Staphylococcus* і одного *Enterococcus* проявлялося посиленням протимікробної активності в 33,3% зразків, не змінювалося у 55,6 % та зменшувалося на 0,8 мм у 11,1 %.

2. Протимікробна дія азитроміцину щодо дослідних мікроорганізмів посилюється всіма біологічно активними комплексами пробіотичного походження, одержаними за авторською методикою (до та після зберігання за температури (–23 ± 1)ºС): зони інгібування росту полірезистентних грампозитивних бактерій збільшувалися на 3,0–5,8 мм у 100% зразків.

3. Максимальна синергічна дія відносно стійких збудників встановлена за умов спільного застосування фільтрату метаболітів сахароміцетів одразу після отримання та зберігання з азитроміцином або ампіциліном на 4,8–6,3 мм. Виключенням став комбінований вплив із ампіциліном щодо полірезистентного штаму *Corynebacterium*: діаметри зон затримки росту мікроорганізму не змінювалися.

4. Доведено збереження протимікробного ефекту структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* та *S. boulardii* після витримки за температури (–23 ± 1)ºС протягом 6 місяців (термін спостереження) по відношенню до полірезистентних грампозитивних мікроорганізмів, що може бути використано при конструюванні препаратів нового покоління.

tural-metabolic complexes with respect to the formation of biofilms by *Corynebacterium* toxigenic representatives. However, when storing the BACs of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* at a temperature of (–23 ± 1)ºC for 6 months, their initial inhibitory activity against the formation of biofilms by toxigenic representatives of *Corynebacterium* is preserved. The presented findings on preserving the synergistic activity of *L. rhamnosus GG* and *S. boulardii* structural-metabolic complexes with antibacterial drugs against multidrug-resistant pathogens when stored in a frozen state at (–23 ± 1)ºC supplement the data of previous own studies. The advantages of our method of freezing compared to other storage ones consist in its simplicity, availability and reliability. Therefore, the results presented in this paper confirm the feasibility of the storage in a frozen state of metabolites at the research and production stages during development of antimicrobials and for the development of 'accompanying drugs' to antibiotics.

Conclusions

1. Combined use of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* structural-metabolic complexes, stored for a long time in a frozen state (–23 ± 1)ºC and freshly obtained ones, with levofloxacin against two representatives of *Staphylococcus* and one of *Enterococcus* in 33.3% of samples enhanced antimicrobial activity, it did not increase in 55.6% and the zone of growth inhibition of microorganisms decreased by 0.8 mm in 11.1%.

2. Antimicrobial activity of azithromycin as for experimental microorganisms is enhanced by all biologically active complexes of probiotic origin, obtained by the author's method (before and after storage at a temperature of (–23 ± 1)ºC: zones of growth inhibition of multidrug-resistant gram-positive bacteria were increased by 3.0–5.8 mm in 100% of samples.

3. The maximum synergistic effect on relatively resistant pathogens was established, when the filtrate of saccharomyces metabolites immediately after obtaining and storage with either azithromycin or ampicillin were jointly applied. The exception was the joint effect with ampicillin on the *Corynebacterium* multidrug-resistant strain: the diameters of microorganism growth inhibition zones did not change.

4. Preservation of antimicrobial effect of *L. rhamnosus* and *S. boulardii* structural-metabolic complexes after exposure at temperature of (–23 ± 1)ºC for 6 months (observation period) against polyresistant gram-positive microorganisms, which can be used to design brand new drugs, has been proven.

Література

1. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Наказ МОЗ України про затвердження методичних вказівок № 167 Київ, 05. 04. 2007 [Internet]. [Цитовано 2020 квіт 05]. Доступно на: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07.
2. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін. Вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків на їхню протимікробну активність. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(4): 311–21.

3. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін. Протимікробна активність продуктів метаболізму *S. boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2017; 54 (3): 50–5.
4. Ісаєнко ОЮ, Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін.; Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», патентовласник. Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій. Патент України на корисну модель № 126603. 25. 06. 2018.
5. Ісаєнко ОЮ., Книш ОВ, Бабич ЄМ, та ін.; Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», патентовласник. Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій. Патент України на корисну модель № 123122. 12.02.2017.
6. Ісаєнко ОЮ. Протидифтерійні властивості структурно-метаболітних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів у тестах *in vitro* та *in vivo*. Фізіологічний журнал. 2019; 65(6): 51–61.
7. Мінухін ВВ, Коваленко НІ, Ткаченко ВЛ, та ін. Нормальна мікрофлора носоглотки як резервуар полірезистентних штамів збудників інфекцій верхніх дихальних шляхів. Анналі Мечниковського інституту. 2015; 2: 195–9.
8. Arnold MF, Caro-Hernandez P, Tan K, et al. Enteric YaiW is a surface-exposed outer membrane lipoprotein that affects sensitivity to an antimicrobial peptide. J Bacteriol. 2014; 196: 436–44.
9. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
10. Cassone M, Otvos L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. Expert Rev Anti Infect. Ther. 2010; 8(6): 703–16.
11. Dosler S, Gerceker A. *In vitro* activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains. Chemotherapy. 2011; 57(6): 511–6.
12. Field D, Seisling N, Cotter P, Ross R, Hill C. Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of Pseudomonas biofilm formation. Front Microbiol [Internet]. [Cited 2019 Oct 26]; 2016; 7: 1713. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01713/full
13. Mogi T, Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. CMLS. 2009; 66(23): 3821–6.
14. Ribeiro S, Fuente-Núñez C, Baquir B, et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates to β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(7): 3906–12.
15. Sharma J, Chauhan DS, Goyal A. Enhancement of antimicrobial activity of antibiotics by probiotics against Escherichia coli-An *in vitro* study. Adv Appl Sci Res. 2014; 5(6): 14–8.
16. Sharma J, Chauhan DS. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa by antibiotics and probiotics combinations- *in vitro* study. Eur J Exp Biol. 2014; 4(6): 10–4.
17. Sharma J, Chauhan DS. *In vitro* study on the role of probiotic strains in potentiation of antimicrobial activity against Staphylococcus aureus. IJPLS. 2015; 6(1): 4161–5.
18. Shenderov BA. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. Microb Ecol Health Dis [Internet]. [Cited 2018 Aug 21]; 2013; 24(1): 20399. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/mehd.v24i0.20399.
19. Tong Z, Zhang Y, Ling J, et al. An *in vitro* study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against Enterococcus faecalis. PLOS ONE [Internet]. [Cited 2019 Feb 20]; 2014; 9(2): e89209. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089209.

References

1. Arnold MF, Caro-Hernandez P, Tan K, et al. Enteric YaiW is a surface-exposed outer membrane lipoprotein that affects sensitivity to an antimicrobial peptide. J Bacteriol. 2014; 196(2): 436–44.
2. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. 217 p.
3. Cassone M, Otvos L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8(6): 703–16.
4. Dosler S, Gerceker A. *In vitro* activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains. Chemotherapy. 2011; 57(6): 511–6.
5. Field D, Seisling N, Cotter P, Ross R, Hill C. Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of Pseudomonas biofilm formation. Front Microbiol [Internet]. [Cited 2019 Oct 26]; 2016; 7: 1713. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01713/full
6. Isayenko OYu. [Anti-diphtheria properties of structural–metabolites complexes of *Lactobacteria* and *Saccharomyces* probiotic strains in tests *in vitro* and *in vivo*]. Physiol J. 2019; 65(6): 51–61.
7. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al. Influence of storage of probiotic broth culture filtrates on their antimicrobial activity. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 311–21.
8. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al. [Antimicrobial activity of metabolites of *S. boulardii* against test cultures of Staphylococci and Corynebacteria]. Pharmacology and Drud Taxicology. 2017; 54 (3): 50–5. Ukrainian.
9. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al., inventors; Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. [Method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria]. Patent of Ukraine N 12. 2018 Jun 25. Ukrainian.
10. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, et al., inventors; Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, assignee. [Method for obtaining metabolites of probiotic strains of bacteria]. Patent of Ukraine N 123122. 2017 Feb 12. Ukrainian.
11. Minukhin VV, Kovalenko NI, Tkachenko VL, et al. [Normal microflora of the nasopharynx as a reservoir of polysaccharide strains of pathogens of upper respiratory tract infections]. Annals of Mechnikov Institute. 2015; 2: 195–9. Ukrainian.
12. Mogi T, Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. CMLS. 2009; 66(23): 3821–6.
13. [Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 167 On approval of methodological instructions 'Study of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs']. MOZ Ukrainy. [Cited 2019 Oct 26]; Kyiv, 05.04.2007. Available from: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07. Ukrainian.
14. Ribeiro S, Fuente-Núñez C, Baquir B, et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates to β-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(7):3906–12.
15. Sharma J, Chauhan DS, Goyal A. Enhancement of antimicrobial activity of antibiotics by probiotics against Escherichia coli-An *in vitro* study. Adv Appl Sci Res. 2014; 5(6): 14–8.
16. Sharma J, Chauhan DS. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa by antibiotics and probiotics combinations- *In vitro* study. Eur J Exp Biol. 2014; 4(6): 10–4.
17. Sharma J, Chauhan DS. In vitro study on the role of probiotic strains in potentiation of antimicrobial activity against Staphylococcus aureus. IJPLS. 2015; 6(1): 4161–5.
18. Shenderov BA. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. Microb Ecol Health Dis [Internet]. [Cited 2018 Apr 21]; 2013; 24(1): 20399. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/mehd.v24i0.20399.

20. Zabawa TP, Pucci MJ, Parr TR Jr, Lister T. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics. Curr Opin Microbiol. 2016; 33: 7–12.

19. Tong Z, Zhang Y, Ling J, et al. An *in vitro* study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against Enterococcus faecalis. PLOS ONE [Internet]. [Cited 2019 Feb 20]; 2014; 9(2): e89209. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089209.
20. Zabawa TP, Pucci MJ, Parr TR Jr, Lister T. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics. Curr Opin Microbiol. 2016; 33: 7–12.