



УДК 615.331:615.076

## Биологические свойства аэрококков и бацилл – компонентов нового ассоциативно-пробиотического комплекса

С.И. Вальчук<sup>1</sup>, Д.А. Степанский<sup>2</sup>, Т.Н. Шевченко<sup>1</sup>, И.П. Кошева<sup>2</sup>, С.А. Рыженко<sup>2</sup>, Г.Н. Кременчущкий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», Днепропетровск, Украина

Разнообразие форм проявлений дисбактериоза, а также ограниченность спектра удельной активности существующих пробиотических препаратов диктует необходимость разработки новых пробиотиков. Основная масса имеющихся на сегодня пробиотических препаратов являются однокомпонентными, в то время как создание сложных ассоциированных пробиотиков по-прежнему остается актуальной задачей. Целью работы было изучить совместимость в едином препарате *B. subtilis* и *A. viridans*, их антагонистическую активность по отношению к разным штаммам тест-культур, а также общего антагонизма, направленного на разные группы бактерий, для последующего создания ассоциативного пробиотического комплекса. Для штаммов аэрококков характерна продукция пероксида водорода и супероксидного радикала, обусловленная функционированием НАД-независимой лактатоксидазы. Антиоксидантная защита аэрококков от действия эндогенных и экскретируемых активных форм кислорода обеспечивается активностью супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы. Для штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 не выявлено взаимного подавляющего эффекта. Установлено максимальное проявление антагонистического эффекта штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в отношении музейных и клинических штаммов тест-культур условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*) по сравнению с антагонистическим эффектом каждого из исследованных штаммов по отдельности, что позволяет рекомендовать их в качестве компонентов для создания нового комплексного пробиотического препарата.

*Ключевые слова:* пробиотики; *Bacillus subtilis* 3; *Aerococcus viridans* 167; антагонизм; дисбиоз

## Biological properties of aerococci and bacilli as a component of new associate-probiotic complex

S.I. Valchuk, D.A. Stepansky, T.N. Shevchenko, I.P. Koshevaya, S.A. Ryzenko, G.N. Kremenchutsky

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine*

*"Dnipropetrovsk Medical Academy of the Health Ministry of Ukraine" State Establishment, Dnipropetrovsk, Ukraine*

Dysbioses of the gastrointestinal tract are common among people of all ages and genders. Development of this pathology is associated with a number of complications, from indigestion to occurrence of malignant disease. Therefore, there is a need in development of measures of their prevention and correction. Probiotics are used as drugs against dysbiosis. Most of the presently known probiotics contain bacterial cells of one species, although combination preparations feature higher efficiency. At the same time, there are difficulties in construction of these drugs, primarily due to incompatibility of physiological properties of microorganisms and mutually antagonistic action of their components. The aim was to examine the compatibility of *Bacillus subtilis* and *Aerococcus viridans* in a single preparation, their antagonistic activity against different strains of test-cultures and general antagonism directed on different groups of bacteria for subsequent formation of associative probiotic complex. Properties of aerococci strains were studied and *A. viridans* 167 strain was selected for inclusion into the probiotic preparation. The tested strain showed the highest indicators of production of hydrogen peroxide, which is one of the mechanisms of antagonistic effect against opportunistic pathogens. General study of biological properties of aerococci strains showed that producing of

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, пр. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49010, Украина  
*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine*

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина  
*State Establishment "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine*  
Tel.: +38-067-566-05-42. E-mail: polishko.labd@mail.ru

hydrogen peroxide and superoxide radical in them was conditioned by functioning of NAD-independent lactatoxidase. It has been determined that antioxidant defense of aerococci from the action of endogenous and active excretable forms of oxygen was provided by activity of superoxide-dismutase and GSH-peroxidase. The method of deferred antagonism found no depressing mutual action between probiotic strains of *B. subtilis* 3 and *A. viridans* 167 at their joint cultivation. Inhibition of growth at the joint application of *A. viridans* 167 and *B. subtilis* 3 strains was recorded for both museum and clinical strains of test-cultures *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*. Separate application of *A. viridans* 167 or *B. subtilis* 3 against strains of these opportunistic pathogens was characterized by relatively less antagonistic effect of each of strains under study. The results allow us to recommend the studied strains of *B. subtilis* 3 and *A. viridans* 167 for use as the components to construct a new associative probiotic preparation.

**Keywords:** probiotics; *Bacillus subtilis* 3; *Aerococcus viridans* 167; antagonism; dysbiosis

## Введение

Много научно-практических разработок, основанных на идее использования микробов-антагонистов, получили повсеместное признание. С успехом применяются биопрепараты, созданные из культур лактобактерий, кишечных палочек, бифидобактерий, пропионовокислых бактерий, стрептококков и других микроорганизмов. Однако разнообразие форм проявлений дисбактериозов, а также ограниченность спектра специфической активности существующих пробиотиков диктуют необходимость разработки новых биопрепаратов (Vitetta et al., 2014). Основным подходом к созданию комплексных пробиотических препаратов, имеющих преимущества перед многочисленным рядом часто несбалансированных пробиотиков, является оптимальный подбор их компонентов на основе физиологических особенностей, входящих в их состав культур бактерий. Это касается, прежде всего, их способности колонизовать разные экологические ниши, не угнетая друг друга, и элиминироваться из макроорганизма в определенное время, замещаясь нормальной естественной микрофлорой, более близкой по рецепторной мозаике макроорганизму (García-Mazco et al., 2015).

Широкое распространение дисбиотических состояний среди взрослого и детского населения обуславливает необходимость проведения коррекционных мероприятий, связанных с восстановлением нормальной микрофлоры всех открытых полостей макроорганизма, что особенно актуально в отношении желудочно-кишечного тракта (Blumstein et al., 2014; Schippa and Conte, 2014; Carding et al., 2015; Unger et al., 2015). Анализ отечественного рынка пробиотиков позволяет сделать однозначный вывод о доминировании на нем импортной продукции, значительную долю которой составляют препараты «Линекс» и «Бифиформ». Эти препараты относятся к поликомпонентным пробиотикам-симбиотикам, которые, с теоретической точки зрения, должны превосходить монопрепараты, так как способны оказывать корригирующее влияние в разных отделах кишечного биотопа.

При создании новых пробиотических ассоциаций должны быть проведены тесты *in vitro* до последующего начала испытаний на животных или человеке *in vivo* (Delgado et al., 2015; Vandenplas et al., 2015). Выбор пробиотиков должен основываться на данных об их эффективности и безопасности. Конструирование пробиотиков должно основываться на выборе штаммов с наиболее эффективными характеристиками в плане оказываемого полезного эффекта и выживаемости в организме, для чего проводят обязательное изучение их

биологических свойств. Наиболее важным свойством пробиотических штаммов бактерий является их антагонистическая активность, которая может проявляться в виде самых различных механизмов (Behnsen et al., 2013). Одним из таких механизмов может быть продукция пероксида водорода, выявленная у многих микроорганизмов (Bukharin et al., 2014). Одной из функций молекулы пероксида водорода является ее сигнальная составляющая, второй не менее важной функцией – антагонистическая активность (Kremenchutsky et al., 2010), поэтому микроорганизмы, способные к продукции перекисных соединений, являются потенциальными компонентами пробиотиков. В этой связи перспективными пробиотическими бактериями можно назвать аэрококки, в основе одного из установленных механизмов антагонистического действия которых на другие микроорганизмы лежит экскреция ими пероксида водорода в процессе окисления молочной кислоты (Kremenchutsky et al., 2002). Продукция этого соединения при дегидрировании лактата возможна в результате функционирования двух разных систем энзимов: а) окисление лактата аэробной НАД-независимой лактатдегидрогеназой (лактатоксидазой) с одно- или двухэлектронным восстановлением молекулярного кислорода; б) дегидрирование лактата НАД-зависимой лактатдегидрогеназой с восстановлением НАД и его последующим окислением соответствующей оксидазой с восстановлением молекулярного кислорода до пероксида водорода. Изучение механизмов продукции пероксида водорода и факторов антиоксидантной защиты является одним из этапов отбора штаммов в пробиотический препарат.

В целом препараты пробиотиков подразделяются на монокомпонентные, многокомпонентные, комбинированные (комплексные). Особое место занимают препараты, созданные на основе самоэлиминирующихся антагонистов: *Bacillus subtilis* («Биоспорин», «Споробактерин»), *Saccharomyces boulardii* («Энтерол»). Это препараты конкурентного действия, не относящиеся к облигатным представителям нормальной микрофлоры кишечника (Butel, 2014; Nieuwboer et al., 2014; Crouzet et al., 2015). Они преодолевают «кислый барьер», не разрушаются антибиотиками, обладают прямым и антагонистическим действием против многих условно патогенных микроорганизмов и повышают местный иммунитет (Moreno de LeBlanc and LeBlanc, 2014). Но большинство подобных препаратов содержит монокультуру микроорганизма-антагониста. Нами же был предложен пробиотический комплекс, состоящий из аэробов *B. subtilis* 3 (компонент «Биоспорина») и микроаэрофилов *Aerococcus viridans* 167 (компонент «А-бактерина»), в котором

есть возможность совместить и усилить полезные свойства двух уникальных препаратов.

Цель работы – оценить совместимость в едином препарате *B. subtilis* 3 и *A. viridans*, их антагонистическую активность по отношению к разным штаммам тест-культур, а также общий антагонизм, направленный на разные группы бактерий для последующего создания ассоциативного пробиотического комплекса.

### Материал и методы исследований

Для создания комплексного пробиотического препарата одним из компонентов выбран штамм *B. subtilis* 3, выделенный из пробиотического препарата «Биоспорин», Биофарма, Украина. В качестве второго компонента проводили выбор штамма аэрококка. Для этого на первом этапе исследований изучили лактатоксидазную активность четырех культур аэрококков, выделенных от человека и включенных в коллекцию культур кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины». Выделение, идентификацию и первичное определение окисления молочной кислоты аэрококками проводили согласно методам, предложенным Kremenchutsky et al. (2009). Концентрацию пероксида водорода в жидкой питательной среде при росте аэрококков определяли на казеиновом бульоне методом Розуп (1951). Среди выделенных аэрококков отбирали культуры, наиболее активно окисляющие молочную кислоту (23, 45, 123, 167). Из ультразвуковых лизатов клеточных культур получали ферментные комплексы с помощью аммония сульфата с последующей очисткой, которые использовали в дальнейшем. Супероксидный радикал определяли методом Pigeolet et al. (1990). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом Kostiuk et al. (1990). Активность СОД выражали в мкмоль/мин·мг<sup>-1</sup> белка. Активность глутатионпероксидазы определяли методом Mojn (1986). Белок определяли методом Lowry (1951). В качестве контрольных энзиматических препаратов при определении продукции супероксида использовали супероксиддисмутазу (СОД) (КФ 1.15.1.1) – лиофильно высушенную очищенную систему изоферментов, выделенную из эритроцитов крови человека (НПО «Ростэпидкомплекс»).

На следующем этапе исследований проводили определение антагонистической активности штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 по отношению друг к другу методом отсроченного антагонизма. На мясопептонный агар (МПА), среды Гаузе-1 и Гаузе-2 по диаметру чашки Петри штрихом (длиной до 4 см и шириной 3–4 мм) производили высев взвеси клеток суточной культуры аэрококков или бацилл исследуемых штаммов, содержащей  $1 \times 10^9$  клеток/мл. Посевы инкубировали 24 часа при температуре 37 °С, после чего штрихом подсеивали вторую культуру. Инкубировали 24, 48 и 72 часа при 37 °С, отмечая характер влияния культур на рост культур.

Антагонистическую активность изучаемых штаммов бактерий проводили на тест-культурах из коллекции кафедры: *Esherihia coli* 374, *Klebsiella ozaenae* 390, *Proteus vulgaris* 401, *Citrobacter freundii* 113/66, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 209p, *Staphylococcus*

*epidermidis* ATCC 14990 и *Candida albicans* 690, а также на клинических изолятах бактерий тех же видов.

Для этого проводили высеив культур *B. subtilis* 3, *A. viridans* 167 и их смеси на МПА штрихом, как описано выше. Через сутки инкубации при 37 °С производили подсев тест-культур штрихами, перпендикулярными росту. После повторной суточной инкубации при 37 °С учитывали зоны подавления роста тест-культур (учитывалась зона отсутствия роста тест-культуры от штриха роста испытываемых штаммов).

Результаты обрабатывали статистически: рассчитывали среднее и ошибку ( $M \pm m$ ). Для сравнения выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ.

### Результаты и их обсуждение

Для выбора второго компонента комплексного пробиотического препарата изучены свойства четырех штаммов аэрококка, выделенных от людей и включенных в коллекцию культур кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины». Определено оптимальное время инкубации аэрококков с целью получения ферментных комплексов с наибольшей активностью, для чего культуры выращивали на казеиновом бульоне 24 часа. Показателем интенсивности роста выступала концентрация пероксида водорода в казеиновом бульоне при росте выбранных культур *A. viridans* (табл. 1).

Максимальный уровень продукции  $H_2O_2$  характерен для культур *A. viridans* 45 и 167 через 10–12 часов инкубирования при 37 °С на казеиновом бульоне. Эти культуры были отобраны для получения ферментных комплексов и дальнейшего изучения их активности. В таблице 2 представлена характеристика лактатоксидазной активности лизатов и ферментных комплексов (ФК), полученных из культур *A. viridans* 45 и 167. Для контроля специфичности действия лактатоксидазы определяли концентрацию накапливающейся в реакционной среде пировиноградной кислоты.

Большой лактатоксидазной активностью обладают ферментные комплексы исследованных культур по сравнению с активностью лизатов. Изучение влияния пероксида водорода, вносимого в систему окисления лактата, на накопление пирувата, а также его действия на химический пируват, показали способность пирувата реагировать с пероксидом. Это явление имеет большое значение для понимания механизма защиты аэрококков от экскретируемого пероксида водорода, так как данные микроорганизмы лишены каталазы и пероксидазы. В результате экспериментов установлено, что продукция пероксида водорода аэрококками является функцией их лактатоксидазной активности.

Активность ксантинооксидазы, альдегидоксидазы и многочисленных флавопротеидов связана с образованием супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) и пероксида водорода ( $H_2O_2$ ). С целью проверки предположения о возможности продукции супероксидного радикала аэрококками в процессе окисления молочной кислоты проведены эксперименты с лизатами клеток аэрококков и частично очищенными ферментными комплексами с лактатокси-

дазной активностью (табл. 3). Удельная продукция супероксида выше у лизата и ФК, полученных из штамма *A. viridans* 167, что можно объяснить особенностями его метаболизма. В результате анализа полученных данных

можно предложить, что процесс образования пероксида водорода у аэрококков имеет двойной характер: а) в результате прямого двухэлектронного восстановления кислорода; б) через дисмутацию супероксида.

Таблица 1

**Продукция пероксида водорода штаммами *A. viridans* при росте на казеиновом бульоне**

| Время инкубации, ч | lg количества бактерий в 1 мл | Исследуемые культуры                                     |              |              |              |
|--------------------|-------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|
|                    |                               | 23   | 45           | 123          | 167          |
|                    |                               | Среднее количество H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мг/мл |              |              |              |
| 0                  | 6,48                          | 0,01 ± 0,001   | 0            | 0            | 0,01 ± 0,001 |
| 2                  | 6,78                          | 0,01 ± 0,001   | 0,01 ± 0,001 | 0,01 ± 0,001 | 0,02 ± 0,002 |
| 4                  | 6,60                          | 0,03 ± 0,001   | 0,48 ± 0,001 | 0,03 ± 0,005 | 0,51 ± 0,002 |
| 6                  | 7,18                          | 0,08 ± 0,001   | 0,25 ± 0,010 | 0,04 ± 0,003 | 0,33 ± 0,011 |
| 8                  | 7,74                          | 0,20 ± 0,001   | 0,57 ± 0,010 | 0,06 ± 0,011 | 0,77 ± 0,011 |
| 10                 | 7,73                          | 0,26 ± 0,020   | 0,80 ± 0,110 | 0,07 ± 0,010 | 1,06 ± 0,120 |
| 12                 | 8,62                          | 0,26 ± 0,010   | 0,73 ± 0,050 | 0,06 ± 0,009 | 0,99 ± 0,050 |
| 14                 | 8,72                          | 0,20 ± 0,010   | 0,65 ± 0,010 | 0,33 ± 0,001 | 0,85 ± 0,020 |
| 16                 | 8,63                          | 0,22 ± 0,010   | 0,65 ± 0,080 | 0,26 ± 0,010 | 0,87 ± 0,080 |
| 18                 | 8,59                          | 0,20 ± 0,010   | 0,65 ± 0,060 | 0,20 ± 0,010 | 0,85 ± 0,080 |
| 20                 | 8,60                          | 0,17 ± 0,003   | 0,51 ± 0,110 | 0,18 ± 0,010 | 0,68 ± 0,110 |
| 22                 | 8,77                          | 0,18 ± 0,010   | 0,57 ± 0,020 | 0,17 ± 0,001 | 0,75 ± 0,030 |
| 24                 | 8,38                          | 0,14 ± 0,020   | 0,65 ± 0,080 | 0,11 ± 0,021 | 0,79 ± 0,100 |
| 32                 | 7,23                          | 0,15 ± 0,020   | 0,54 ± 0,010 | 0,14 ± 0,020 | 0,69 ± 0,030 |
| 48                 | 6,30                          | 0,11 ± 0,020   | 0,44 ± 0,080 | 0,17 ± 0,031 | 0,55 ± 0,100 |
| 72                 | 5,90                          | 0,06 ± 0,002   | 0,40 ± 0,010 | 0,17 ± 0,025 | 0,46 ± 0,012 |

Таблица 2

**Характеристика лактатоксидазной активности разных фракций клеток симбионтных аэрококков *A. viridans* 45 и 167**

| Фракции штаммов | мкмоль пирувата за 1 час на 1 мг белка | Активность лактатоксидазы, ЕД активности на 1 мг белка |
|-----------------|--|--|
| Лизат 45        | 11,1 ± 0,8                             | 60,2 ± 5,6   |
| ФК 45           | 380,1 ± 8,9                            | 766,0 ± 21,6   |
| Лизат 167       | 10,1 ± 2,1                             | 69,2 ± 4,6   |
| ФК 167          | 132,8 ± 9,7                            | 851,7 ± 36,9   |

Таблица 3

**Продукция супероксидного аниона в процессе окисления лизатом и ферментным комплексом 0,045 М лактата лития**

| Клетки и фракции штаммов | Удельная активность продукции супероксида (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) на 1 мг белка ФК за 1 мин. | Влияние на продукцию O <sub>2</sub> <sup>-</sup> супероксид-дисмутазы, мкмоль/мин. · мг белка |
|--------------------------|---|---|
| Лизат 45                 | 1,35 ± 0,02   | 0,95 ± 0,23   |
| ФК 45                    | 0,66 ± 0,03   | 0,33 ± 0,01   |
| Лизат 167                | 3,10 ± 0,80   | 1,20 ± 0,06   |
| ФК 167                   | 13,80 ± 0,97  | 1,70 ± 0,30   |

Результаты исследования активности ферментов антиоксидантной защиты аэрококков супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы лизатов и ФК представлены в таблице 4. Приведенные данные указывают на наиболее активную продукцию культурой *A. viridans* 167 биологически активных веществ (пероксида водорода, супероксида), а также активность лактатоксидазы, супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы, что позволило рекомендовать этот штамм для включения в качестве второго компонента в новый комплексный пробиотический препарат.

На следующем этапе изучали антагонизм культур относительно друг друга, что позволило определить возможность создания на их основе комплексного препарата. Анализ результатов эксперимента показал, что при подсевании в разные сроки инкубации *A. viridans* 167 к

*B. subtilis* 3 и наоборот на МПА и на средах Гаузе-1 и 2 взаимный антагонизм отсутствовал (табл. 5). При исследовании возможного антагонизма между культурами *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на среде Гаузе-2 после 24 и 48 часов инкубации антагонизм не наблюдался, а после 72 часов инкубации при подсевании аэрококка к бацилле антагонизм оказался незначительным, что указывает на совместимость штаммов и возможность создания на их основе комплексного пробиотического препарата.

Показателем активности препаратов на основе микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры являются антагонистические свойства бактерий, которые составляют основу пробиотического препарата (Behnsen et al., 2013; Vandenplas et al., 2015), поэтому на следующем этапе исследований оценивали антагонистическую активность штаммов *A. viridans* 167 и

*B. subtilis* 3 по отношению к культурам условно-патогенных микроорганизмов. Эффективность комплексного препарата проявляется в возможности подавления роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов каждым из компонентов препарата по отдельности

и при совместном культивировании. Изучение антагонистической активности каждого из выбранных штаммов по отдельности показало, что при подсевании к культуре *A. viridans* 167 после 24 ч инкубации тест-культур имело место угнетение их роста (табл. 6).

Таблица 4

**Супероксиддисмутазная и GSH-пероксидазная активности лизатов и ФК аэрококков**

| Штаммы    | Удельная активность супероксиддисмутазы, мкмоль/мин. · мг белка | Удельная активность GSH-пероксидазы, ЕД на 1 мг белка за 1 мин. |
|-----------|---|---|
| Лизат 45  | 5,45 ± 0,70   | 0,44 ± 0,04   |
| ФК 45     | 8,35 ± 1,02   | 0,95 ± 0,23   |
| Лизат 167 | 11,10 ± 0,80  | 1,20 ± 0,06   |
| ФК 167    | 14,35 ± 0,97  | 11,70 ± 0,30  |

Таблица 5

**Взаимная антагонистическая активность *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на разных питательных средах**

| Питательные среды | Время инкубации, ч                      |    |           |   |    |    |
|-------------------|---|----|-----------|---|----|----|
|                   | <i>B. subtilis</i> к <i>A. viridans</i> |    |           | <i>A. viridans</i> к <i>B. subtilis</i> |    |    |
|                   | 24                                      | 48 | 72        | 24                                      | 48 | 72 |
|                   | Зоны задержки роста, мм                 |    |           |   |    |    |
| МПА               | –                                       | –  | –         | –                                       | –  | –  |
| Гаузе-1           | –                                       | –  | –         | –                                       | –  | –  |
| Гаузе-2           | –                                       | –  | 4,0 ± 1,0 | –                                       | –  | –  |

Примечание: «–» – отсутствие зоны задержки роста; n = 6 для каждой питательной среды

Таблица 6

**Антагонистическая активность *A. viridans* 167 к штаммам тестовых культур (n = 10)**

| Штаммы тест-культур               | Зона задержки роста, мм |                    |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
|                                   | музейные штаммы         | клинические штаммы |
| <i>Escherichia coli</i>           | 15 ± 4                  | 13 ± 4             |
| <i>Proteus vulgaris</i>           | 12 ± 4                  | 9 ± 4              |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>         | 13 ± 1                  | 11 ± 1             |
| <i>Citrobacter freundii</i>       | 13 ± 3                  | 11 ± 3             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 11 ± 3                  | 8 ± 3              |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 16 ± 2                  | 14 ± 2             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 17 ± 3                  | 15 ± 3             |
| <i>Candida albicans</i>           | 18 ± 2                  | 13 ± 2             |

Максимальную антагонистическую активность штамм *A. viridans* 167 проявил по отношению к штаммам *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli*. К штаммам тест-культур *P. vulgaris*, *C. freundii*, *K. ozaenae*, *P. aeruginosa* наблюдали менее выраженный антагонизм.

Изучение антагонистических свойств штамма *B. subtilis* 3 по отношению к тест-культурам условно-патогенных микроорганизмов позволило выявить отличия по сравнению с действием штамма аэрококка (табл. 7). Штамм *B. subtilis* 3 проявляет максимальную антагонистическую активность по отношению к штаммам *S. epidermidis* и *C. albicans*, умеренно высокую – к *S. aureus*, *E. coli*, *C. freundii*, *K. ozaenae*, *P. vulgaris* и низкую – к штаммам *P. aeruginosa*.

Для создания ассоциированного пробиотического комплекса на основе бацилл и аэрококков исследовали их общую антагонистическую активность по отношению к представителям условно-патогенной микрофлоры (табл. 8). Общая активность штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в 1,5–2,0 раза выше, чем антагонистическая активность каждого из этих двух штаммов в отдельности, причем отме-

чается активное подавление роста всех тест-культур без исключения.

Таблица 7

**Антагонистическая активность *B. subtilis* 3 к штаммам тест-культур (n = 10)**

| Штаммы тест-культур               | Зона задержки роста, мм |                    |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
|                                   | музейные штаммы         | клинические штаммы |
| <i>Escherichia coli</i>           | 12 ± 3                  | 11 ± 3             |
| <i>Proteus vulgaris</i>           | 11 ± 3                  | 10 ± 3             |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>         | 13 ± 2                  | 12 ± 2             |
| <i>Citrobacter freundii</i>       | 13 ± 1                  | 10 ± 2             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 8 ± 1                   | 7 ± 1              |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 12 ± 3                  | 12 ± 3             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 15 ± 3                  | 14 ± 3             |
| <i>Candida albicans</i>           | 15 ± 2                  | 12 ± 2             |

Таблица 8

**Общая антагонистическая активность *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 к штаммам тест-культур (n = 10)**

| Штаммы тест-культур               | Зона задержки роста, мм |                    |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
|                                   | музейные штаммы         | клинические штаммы |
| <i>Escherichia coli</i>           | 26 ± 1                  | 21 ± 2             |
| <i>Proteus vulgaris</i>           | 26 ± 1                  | 24 ± 1             |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>         | 24 ± 2                  | 26 ± 2             |
| <i>Citrobacter freundii</i>       | 28 ± 2                  | 23 ± 3             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 23 ± 3                  | 27 ± 1             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 28 ± 2                  | 22 ± 1             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 29 ± 1                  | 25 ± 2             |
| <i>Candida albicans</i>           | 28 ± 3                  | 20 ± 3             |

Полученные результаты свидетельствуют об усилении антагонистического действия аэрококков и бацилл при их ассоциации по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, без оказания взаимного

антагонистического воздействия, что позволяет рекомендовать штаммы *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в качестве компонентов нового высокоэффективного ассоциативного пробиотического комплекса, содержащего в своем составе представителей нормальной микрофлоры.

### Выводы

Все исследованные штаммы аэрококков, выделенные из организма человека, продуцировали пероксид водорода при культивировании *in vitro*. Продукция пероксида водорода и супероксидного радикала у аэрококков обусловлена функционированием НАД-независимой лактатоксидазы. Антиоксидантная защита аэрококков от действия эндогенных и экскретируемых активных форм кислорода обеспечивается активностью супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы.

Штаммы *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 не оказывают взаимного антагонистического эффекта, что позволяет их совместное культивирование и возможность одновременного использования как средства коррекции дисбиозов.

Показана в 1,5–2,0 раза более высокая эффективность совместного антагонистического действия штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на все использованные тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов по сравнению с эффективностью антагонистического воздействия каждого из исследованных штаммов по отдельности, что позволяет создать на их основе новый комплексный пробиотический препарат.

### Библиографические ссылки

- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., 2013. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a010074.
- Blumstein, D.T., Levy, K., Mayer, E., Harte, J., 2014. Gastrointestinal dysbiosis. *Evol. Med. Public Health.* pii: eou029.
- Bukharin, O.V., Shibnev, A.V., Cherkasov, S.V., 2014. Rol pro- i antyoksydantov mikroorhanizmov v rehuliatsii mekhanizmov homeostaza simbioza (na modeli vahinalnoho biotopa) [The role of pro- and antioxydants of microorganisms in regulation symbiotic homeostasis mechanisms (on a model of vaginal biotop)]. *Zh. Mikrobiol.* 3, 9–15 (in Russian).
- Butel, M.J., 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Med. Mal. Infect.* 44(1), 1–8.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., Owen, L.J., 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26191.
- Crouzet, L., Rigottier-Gois, L., Serror, P., 2015. Potential use of probiotic and commensal bacteria as non-antibiotic strategy against vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 8, pii: fnv012.
- Delgado, S., Leite, A.M., Ruas-Madiedo, P., Mayo, B., 2015. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus spp.* strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front. Microbiol.* 14(5), 766.
- García-Mazcorro, J.F., Garza-González, E., Marroquín-Cardona, A.G., Tamayo, J.L., 2015. Characterization, influence and manipulation of the gastrointestinal microbiota in health and disease. *Gastroenterol. Hepatol.* pii: S0210-5705(15)00024-2.
- Kostiuk, V.A., Potapovych, A.Y., Kovaleva, Z.V., 1990. Prostoi i chuvstvitel'nij metod opredeleniia aktivnosti superoksiddismutazi, osnovannij na reaktsii okisleniia kvartetina [Simple and sensitive method of determination of superoxidizedismutase activity, based on the reaction of quercitine oxidation]. *Voprosy medicinskoj himii* 2, 88–91 (in Russian).
- Kremenchutsky, G.N., Ryzhenko, S.A., Koshevaia, Y.P., Medinskaia, O.A., Kulyshenko, S.H., Sharun, A.V., 2002. Issledovanie antahonisticheski aktivnikh metabolitov, produtsiruemikh *Aerococcus viridans* [The research of antagonistic active metabolites, produced by *Aerococcus viridans*]. *Zhurnal Vinnitskoho Hosudarstvennoho Universiteta* 2, 318–319 (in Russian).
- Kremenchutsky, G.N., Stepanskyi, D.O., Yurhel, L.H., Koshova, I.P., Krushynska, T.Y., Valchuk, S.O., Kondratiev, A.Y., 2010. Informatsiini komunikatsii mikroorhanizmv [Informational communications of microorganisms]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 1, 66–70 (in Ukrainian).
- Kremenchutsky, G.N., Yurhel, L.H., Sharun, A.V., Stepanskyi, D.O., Valchuk, S.O., Koshova, I.P., Parusov, A.V., 2009. Metody vydilennia ta identyfikatsii hrampozytvnykh katalazonehatyvnykh kokiv: Metodychni rekomendatsii [Methods of isolation and identification of grampositive catalase-negative cocci: manual]. Kyiv (in Ukrainian).
- Lowry, O.H., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193(1), 265–275.
- Moin, V.Y., 1986. Prostoi i chuvstvitel'nij metod opredeleniia hlutationperoksidazi v eritrotsitakh [Simple and sensitive method of determination of glutationperoxidase in red blood cells]. *Lab. Delo* 12, 724–727 (in Russian).
- Moreno de LeBlanc, A. de, LeBlanc, J.G., 2014. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World J. Gastroenterol.* 20(44), 16518–16528.
- Nieuwboer, M. van den, Claassen, E., Morelli, L., Guarner, F., Brummer, R.J., 2014. Probiotic and synbiotic safety in infants under two years of age. *Benef. Microbes.* 5(1), 45–60.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.-D., Remade, J., 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 51(3), 283–297.
- Pozyn, M.E., 1951. Perekys vodoroda i perekisnie soedyneniia [Hydrogen peroxide and peroxide compounds]. *Hosudarstvennoe Nauchno-Tekhnicheskoe Izdatelstvo Khimicheskoi Literatury, Moscow* (in Russian).
- Schippa, S., Conte, M.P., 2014. Dysbiotic events in gut microbiota: Impact on human health. *Nutrients* 6(12), 5786–5805.
- Unger, S., Stintzi, A., Shah, P., Mack, D., O'Connor, D.L., 2015. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatr. Res.* 77(1–2), 205–213.
- Vandenplas, Y., Huys, G., Daube, G., 2015. Probiotics: An update. *J. Pediatr. (Rio J)* 91(1), 6–21.
- Vitetta, L., Bambling, M., Alford, H., 2014. The gastrointestinal tract microbiome, probiotics, and mood. *Inflammopharmacol.* 22(6), 333–339.

Надійшла до редколегії 21.03.2015