

УДК 663.11; 579.61
DOI 10.17721/1728.2748.2022.91.19-23

Д. Остапченко¹, студ.,
О. Короткий¹, д-р біол. наук,
О. Цирюк¹, д-р біол. наук,
Ю. Пенчук¹, канд. біол. наук,
Л. Сішел², голов. наук. співроб.
¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
²Стала Біотікс, Колорадо, США

АНТИМІКРОБНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЛІЗАТУ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS V*

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я стійкість до антибіотиків зростає до небезпечно високого рівня в усьому світі. Виникають нові механізми резистентності, загрожуючи нашій здатності лікувати поширені інфекційні захворювання, тому пошук нових протимікробних засобів природного походження є глобальною проблемою. Метою пропонуваного дослідження було визначення антимікробної активності ліофілізованого ферментативного лізату клітин штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus V*. Об'єктом дослідження був препарат Дел-Імун V[®], який позиціонується як протиалергічний та імуностимулюючий. Зусилля дослідників були спрямовані на більш повне розкриття потенціалу препарату, зокрема його протимікробної дії. Антимікробну активність визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом дворазових серійних розведень у м'ясопептоновому бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі – для дріжджів. Як тестові культури використовували грамнегативні (*Escherichia coli* IEM-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas sp. MI-2*) та грампозитивні (*Bacillus subtilis* BT-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1) бактерії, а також дріжджі (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* БВС-65). Визначено, що значення МІК нативного препарату Дел-Імун V[®] для досліджуваних бактеріальних тест-культур нижчі у вісім разів, для дріжджів – у чотири – вісім разів порівняно з показниками термічно інактивованого препарату. Доведено антибактеріальну та антифунгальну активність препарату Дел-Імун V[®]. Показано, що спектр протимікробної активності охоплює грампозитивні та грамнегативні бактерії, а також дріжджоподібні гриби роду *Candida*. Мінімальні інгібуючі концентрації були досить низькими: у діапазоні від 1,0 до 4,0 мг/мл для бактеріальних культур та від 62,5 до 125 мг/мл для дріжджів. Найменш чутливою до дії препарату виявилася культура *B. subtilis* BT-2 (МІК 12,5 мг/мл). Зазначено, що ліофілізований ферментативний лізат молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus V* володіє антибактеріальними та антифунгальними властивостями.

Ключові слова: бактеріальний лізат, пробіотик, молочнокислі бактерії, антимікробна активність.

Вступ. Сучасні дослідження складу та функцій мікробіому людини становлять неабиякий інтерес, зважаючи на захисну функцію щодо патогенної мікробіоти. Препарати на основі пробіотичних мікроорганізмів широко застосовуються для профілактики інфекційних захворювань [35].

Дослідження показали, що пробіотики запобігають колонізації кишківника патогенними й умовно патогенними мікроорганізмами завдяки певним механізмам, включаючи посилення бар'єрної функції епітелію [1] і модуляцію імунної відповіді [26]. Це може відбуватися також за допомогою пригнічення факторів вірулентності та пригнічення прикріплення клітин до епітелію [3]. Наприклад, види лактобацил інгібують адгезію *Enterobacter sakazakii* до кишкового слизу шляхом конкурентного виключення [4]. Інші дослідження показали, що деякі пробіотики збільшують вироблення кишкового муцину, пригнічуючи адгезію клітин патогенів до епітеліальних клітин кишківника [5]. Пробиотики також здатні виробляти метаболіти із широким спектром біологічної дії. Зокрема, на загоєння ран може впливати позаклітинний полісахарид, який продукується пробіотичними бактеріями і має виразні протизапальні властивості [7]. Також виявлено, що деякі штами пробіотиків можуть поліпшувати процеси загоєння ран завдяки антибактеріальній, протизапальній дії, стимуляції процесів ангіогенезу та синтезу протеогліканового комплексу [8, 9].

Молочнокислі бактерії можуть синтезувати протимікробні пептиди (бактеріоцини), такі як низин А, педіоцин, ентероцин, сакацин, лактокоцин, гелветицин, реутерицин, лактацин, саліварицин, мутацин, гасерицин тощо [20, 21]. Бактеріоцини – це невеликі пептиди або білки, що секретируються або пов'язані з поверхнею. Завдяки активності за дуже низької концентрації (наномольної) вони можуть вбивати бактерії-мішені, діючи лише на рівні клітинної поверхні (мембрани чи клітинної стінки) [15]. Деякі бак-

теріоцини беруть участь у розсіюванні протонного градієнта через бактеріальну цитоплазматичну мембрану, інші інгібують біосинтез клітинної стінки або створюють пори, що спричиняють порушення іонного гомеостазу [16, 17]. Незважаючи на те, що деякі з них використовувалися близько 50 років як харчові добавки (для запобігання псуванню і харчовим інфекціям), було зареєстровано лише кілька випадків стійкості до бактеріоцинів [18, 19].

До прикладу, *Lactobacillus reuteri* здатна синтезувати принаймні три молекули, що пригнічують зростання бактерій: реутерин, реутероциклін і реутерицин. Реутерин має молекулярну масу нижче 100 Да та виявляє антимікробну активність завдяки комплексу, утвореному з амінами кишківника [12]. Реутероцикліни – це невеликі гідрофобні сполуки з молекулярною масою 349 Да, які демонструють широкий спектр інгібування проти *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua* та *Staphylococcus aureus*. На останніх мікроорганізмах продемонстрований бактерицидний спосіб дії, що запускає лізис клітин [13]. Реутерицин 6 є бактеріоциноподібною білковою молекулою з молекулярною масою 2700 Да. Її амінокислотний аналіз підтвердив наявність 67 % гідрофобних і полярних нейтральних амінокислот [14].

Крім бактеріоцинів, молочнокислі бактерії синтезують кислоти та перекис водню, які також здійснюють антимікробну дію [10]. Є дані, що штами молочнокислих бактерій здатні пригнічувати зростання *Listeria monocytogenes* за рахунок продукції антибіотиків: *L. lactis* 41FLL3 продукує низин Z, а *Lactobacillus sakei* 1151 – сакасин Р. Штами *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus rhamnosus* 17D10 та *Lactobacillus helveticus* 4D5 характеризуються високою протеолітичною активністю. Усі штами здатні виділяти біоактивні пептиди з антимікробною, антигіпертензивною та опіоїдною активністю [11].

Однією із форм пробіотичних препаратів є бактеріальні лізати. Бактеріальні лізати представлені на ринку

вже кілька десятиліть і дотепер у багатьох країнах світу доступні кілька різних торгових марок. Вважають, що ці препарати спричиняють місцеві та системні імунотропні ефекти. Крім цього, лізати бактерій спричиняють захисну дію на організм, завдяки якій відбувається зменшення симптомів, пов'язаних із респіраторними інфекціями. Лікарські засоби на основі бактеріальних лізатів дозволені для застосування при різних показаннях, включаючи профілактику та/або лікування різних типів респіраторних інфекцій. Проте результати клінічних випробувань різні, а незважаючи на заяви про широкую імунну активацію механізм дії бактеріальних лізатів усе ще залишається предметом дискусій.

Мета дослідження: дослідити антимікробну активність дієтичної добавки Дел-Імун V[®], основу якої становить ліофілізований ферментативний лізат клітин штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* V.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень була дієтична добавка Дел-Імун V[®], що виробляється ТОВ "Міріммунофарм" (Україна). Препарат містить ліофільно висушений лізат *Lactobacillus rhamnosus* V.

Як тест-культури при визначенні антимікробної активності препарат застосовували штами бактерій *Escherichia coli* IEM-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas* sp. МІ-2 та дріжджі *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* (РЕ-2, *Candida utilis* БВС-65) із колекції живих культур кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій (Україна).

Для тестування антимікробної активності використовували зразки препарату Дел-Імун V[®] різної концентрації. Для цього вміст капсули (25 мг) розчиняли у стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і розводили цим буфером до необхідної концентрації.

Антимікробну активність зразків препарату аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [24]. Визначення МІК здійснювали методом дворазових серійних розведень у м'ясо-пептоновому бульйоні (МПБ) (Макрохім, Україна) для бактерій і рідкому пивному суслі (вміст сухих речовин 2 %) для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину зразка препарату Дел-Імун V[®] максимальної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили в наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних

дванадцяти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Кінцевий об'єм кожної пробірки становив 1 мл (МПБ або сусло та розчин зразка препарату), а концентрація препарату в кожній наступній пробірці знижувалася удвічі. Як негативний контроль використовували стерильне поживне середовище. Додатковим контролем був зразок препарату Дел-Імун V[®] після стерилізації в автоклаві ВК-75 (Україна). Параметри стерилізації становили: тиск P = 0,05 МПа та час t = 30 хв. Далі в кожну із пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10⁵–10⁶ КУО/мл) і перемішували. Пробірки інкубували 24 год при 28–30 °С для бактерій і 24–26 °С для дріжджів. Результати візуально оцінювали за помутнінням середовища: (+) – пробірки, у яких спостерігали помутніння середовища (зростання тест-культури), (–) – помутніння не було (зростання не було). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину визначали як концентрацію препарату в останній пробірці, де спостерігалось зростання.

Усі досліди повторювали тричі, кількість паралельних визначень в експериментах – від трьох до п'яти. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у [24]. Різницю між середніми показниками вважали статистично значущою лише на рівні значущості p < 0,05.

Результати та їх обговорення. Згідно з літературними даними препарат Дел-Імун V[®] характеризується інтерферогенною активністю і здатністю стимулювати синтез фактору некрозу пухлин альфа [22, 23]. Дані стосовно антимікробної активності препарату в літературі відсутні.

Наведені в табл. 1 дані свідчать про те, що препарат здатний чинити антимікробну дію, причому мінімальні інгібуючі концентрації для нативного препарату щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур були у 8–125 разів нижчими, ніж показники термічно інактивованого контролю. Зазначимо, що препарат Дел-Імун V[®] виявляв високу антимікробну дію не тільки щодо грампозитивних (*B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1), але й грамотригативних (*E. coli* IEM-1, *P. vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas* sp. МІ-2) бактерій.

Найменш чутливою до дії препарату виявилася культура *B. subtilis* БТ-2 (МІК 12,5 мкг/мл). Для інших культур МІК була в діапазоні від 1,0 до 4,0 мкг/мл. Отримані дані свідчать, що до препарату виявили чутливість культури, які найчастіше спричиняють інфекційні захворювання.

Таблиця 1. Антибактеріальна активність препарату Дел-Імун V[®]

Мінімальні інгібуючі концентрації, мкг/мл	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спору)	<i>E. coli</i> IEM-1	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2
Препарат	12,5	4,0	2,0	1,0	1,0
Контроль 1 (препарат після автоклавування)	125,0	250,0	250,0	125,0	125,0
Контроль 2 (стерильне МПБ)	0	0	0	0	0

Примітка: при визначенні мінімальних інгібуючих концентрацій похибка не перевищувала 5 %.

Результати дослідження антифунгальних властивостей бактеріального лізату, який міститься в препараті, проведеного з використанням дріжджів роду *Candida* (табл. 2), свідчать про те, що препарат Дел-Імун V[®] меншою мірою виявляє антифунгальну активність порівняно з антибактеріальною. Мінімальна інгібуюча

концентрація була в діапазоні від 62,5 до 125 мкг/мл, що в 4–8 разів менше за показники термічно інактивованого контролю. Незважаючи на це, такі концентрації можна покладати терапевтичними з огляду на низький рівень токсичності препарату.

Таблиця 2. Антифунгальна активність препарату Дел-Імун V®

Мінімальні інгібуючі концентрації, мкг/мл	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida utilis</i> БВС-65
Препарат	125,0	62,5	125,0
Контроль 1 (препарат після автоклавування)	500,0	500,0	500,0
Контроль 2 (стерильне сусло)	0	0	0

Примітка: при визначенні мінімальних інгібуючих концентрацій похибка не перевищувала 5 %.

Досліди проводили *in vitro*, тому безпосередня дія препарату на мікроорганізми очевидна.

Дані про використання в медичній практиці лізатів пробіотичних культур для боротьби з інфекційними захворюваннями в науковій літературі доволі обмежені. Наприклад, місцеве застосування оброблених ультразвуком штамів *Streptococcus salivarius* пацієнтами, які страждають на atopічний дерматит, поліпшило бар'єрну функцію, імовірно, за рахунок підвищення рівня керамідів у роговому шарі [25]. Місцеве застосування *L. plantarum* для лікування інфікованих ран сприяло відновленню тканин на моделі опіків у мишей і запобігало інфекції при хронічних виразках та опіках ніг у людей [26, 27]. Проте механізми цих ефектів вивчені недостатньо.

Є дані, які свідчать про те, що патогенний потенціал *Candida* spp. залежить від їхньої здатності виробляти біоплівки на абіотичних і біотичних поверхнях [28]. При дослідженні протикандидозної активності неочищеного екстракту 13 різних штамів *Lactobacillus* [29] з'ясовано, що значення МІК лежить у діапазоні від 1,25 до 10 мг/мл. Також підтверджено антимікробна активність супернатанту лізату культури *L. paracasei* та ідентифікованого білка з молекулярною масою приблизно 25000 Да проти грампозитивних, грамотришечних бактерій і дріжджів *in vitro* [30].

Супернатанти сирого фільтрату з *L. acidophilus* ATCC 314, *L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014 і *L. reuteri* ATCC 55730 здатні впливати на утворення гіфів *Candida albicans* у попередньо сформованій біоплівці та на розвиток зрілої біоплівки. Інгібуючі ефекти залежали від штамів лактобацил. Лізати *L. plantarum*, *L. acidophilus* та *L. reuteri* порушували утворення біоплівки, тоді як *L. plantarum* та *L. reuteri* – тільки біоплівки клітин. Нещодавні дослідження також підтвердили, що види *Lactobacillus* можуть зменшити утворення гіфів *C. Albicans* [31, 32] шляхом вивільнення антимікробних сполук.

У клінічному дослідженні з використанням екстракту *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) [33] спостерігали зменшення легкого ураження акне зі зменшенням еритеми та відновленням шкірного бар'єру. Значне пригнічення розвитку atopічних уражень шкіри, спричинених кліщами та іншими патогенами, спостерігалось при місцевому застосуванні гомогенізованих *Lactobacillus reuteri* у воді [34].

Висновки. У результаті проведеного дослідження підтверджено антибактеріальну та антифунгальну активність препарату Дел-Імун V®. З'ясовано, що спектр протимікробної активності охоплює грампозитивні та грамотришечні бактерії, а також дріжджоподібні гриби роду *Candida*. Протимікробну активність виявляли зразки препарату, які не були термічно інактивовані. Це свідчить про те, що активні речовини є термолабільними.

Мінімальні інгібуючі концентрації були досить низькими: у діапазоні від 1,0 до 4,0 мкг/мл для бактеріальних культур та від 62,5 до 125 мкг/мл для дріжджів. Найменш чутливою до дії препарату виявилася культура *B. subtilis* БТ-2 (МІК 12,5 мкг/мл).

Отримані результати свідчать, що препарат Дел-Імун V® є перспективним для профілактики та допоміжної терапії інфекційних захворювань мікробної етіології.

Список використаних джерел

1. Parsool N. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli* – infected T84 cells / N. Parsool, P. Rampai // Research in Microbiology. – 2005. – 156. – P. 256–262. – doi: 10.1016/j.resmic.2004.09.013
2. Bedi D. A. *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli* / D. A. Bedi, S. Feizizadeh, A. Jafarian-Dehkordi // Res Pharm. – 2013. – Sci. 4. – P. 260–268.
3. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine / F. Backhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg et al. // Science. – 2005. – 307. – P. 1915–1920. – doi:10.1126/science.1104816
4. Collado M. C. Specie probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus / M. C. Collado, E. Isolauri, S. Salminen // FEMS Microbiol Lett. – 2008. – 285. – P. 58–64. – https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x
5. Prince T. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus Aureus* Induced Cell Death by Competitive Exclusion / T. Prince, A. J. McBain, C. A. O'Neill // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – 15. – P. 78–51. – doi: 10.1128/AEM.00595-12
6. *Lactobacilli* reduce Cell Cytotoxicity Caused by *Streptococcus pyogenes* by Producing Lactic Acid that Degrades the Toxic Component Lipoteichoic Acid / L. Maudsdotter, H. Jonsson, S. Roos, A. B. Jonsson // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – 55. – P. 1622–88. – https://doi.org/10.1128/AAC.00770-10
7. Probiotics ameliorate pioglitazone-associated bone loss in diabetic rats / A. Gholami, M. H. Dabbaghmanesh, Y. Ghasemi et al. // Diabetology & Metabolic Syndrome. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – doi: 10.21203/rs.3.rs-32789/v2
8. Supportive role of probiotic strains in protecting rats from ovariectomy-induced cortical bone loss / N. Montazeri-Najafabady, Y. Ghasemi, M. H. Dabbaghmanesh et al. // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 1145–1154. – doi: 10.21203/rs.3.rs-32789/v1
9. Tsiouris C. G. Human microflora, probiotics and wound healing / C. G. Tsiouris, M. G. Tsiouri // Wound Medicine. – 2017. – Vol. 19. – P. 33–38. – doi: 10.1016/j.wndm.2017.09.006
10. Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods / J. Zhu, G. L. Shengjie, Hongyan, Yu Hansong // Research Article. – 2018. – doi: https://doi.org/10.1155/2018/5416725
11. Antimicrobial Potential of Food Lactic Acid Bacteria: Bioactive Peptide Decrypting from Caseins and Bacteriocin Production / S. Nebbia, C. Lamberti, G. Lo Bianco et al. // Microorganisms. – 2021. – Jan; 9(1). – P. 65. – doi: 10.3390/microorganisms9010065
12. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin / C. Engels, C. Schwab, J. Zhang et al. // Sci Rep. – 2016. – Nov. 7. – 6. – P. 36246.
13. Reuterin 6, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6 / T. Toba, S. K. Samant, E. Yoshioka, T. Itoh // Lett. Appl. Microbiol. – 1991. – 13. – P. 281–286. – doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00629.x
14. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584 / M. G. Gänzle, A. Hölzel, J. Walter et al. // Appl Environ Microbiol. – 2000. – Oct. 66(10). – P. 4325–33.
15. Anti-*S. aureus* and Anti-*L. Monocytogenes* Molecules Produced by Cheese-Isolated Lactic Acid Bacteria / C. Lamberti, F. Genovese, J. D. Coisson et al. // Czech J. Food Sci. – 2014. – 32. – P. 7. – doi: 10.17221/505/2012-CJFS
16. Van Heijenoort J. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan / J. van Heijenoort // Microbiol Mol Biol Rev. – 2007. – Dec. 71(4). – P. 620–35.
17. Zacharof M. P. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article / M. P. Zacharof, R. W. Lovitt // APCBEE Procedia. – 2012. – 2. – P. 50–56. – doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010
18. Nishie M. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications / M. Nishie, J. Nagao, K. Sonomoto // Biocontrol Sci. – 2012. – Mar. 17(1). – P. 1–16.
19. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147 / C. M. Guinane, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – Jul. 260(1). – 77–83.
20. Mokoena M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review / M. P. Mokoena // Molecules. – 2017. – Jul. 26; 22(8).
21. Perez R. H. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications / R. H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto // Microb Cell Fact. – 2014. – Aug. 29. – 13 Suppl 1():S3.

22. Study of Interferonogenous Activity of the New Probiotic Formulation Del-ImmuneV® / L. Sichel, N. A. Timoshok, V. S. Pidgorskyi, N. Y. Spivak // J. Prob. Health. – 1: 107. – doi: 10.4172/2329-8901.1000107
 23. Effects of dry enzymatic lysate Del-immune V® on cytokine production in the experimental models / S. V. Pidgorskyi, L. N. Shynkarenko-Sichel, N. A. Timoshok et al. // Microbiology & Biotechnology. – 2011. – № 3. – P. 23–36. – DOI: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2011.3\(15\).92882](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2011.3(15).92882)
 24. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil / T. Pirog, T. Shevchuk, I. Voloshina, N. Gregirchak // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 51–55. – <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/613>
 25. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB) / E. Pingitore, E. Salvucci, F. Sesma, M. A. Nader // Lett. Appl. Microbiol. – 2007. – 46:174. – 180. – www.researchgate.net/publication/237411008_Different_strategies_for_purification_of_antimicrobial_peptides_from_Lactic_Acid_Bacteria_LAB
 26. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in bums / C. Peral, M. H. Huaman Martinez, C. J. Valdez // International Wound Journal. – 2009b. – 6:73–81.
 27. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum* / M. C. Peral, M. M. Rachid, M. N. Gobbato et al. // Clin. Microbiol. Infect. – 2009a. – 16:281–286.
 28. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: An update / F. C. Ribeiro, R. D. Rossoni, P. P. De Arros et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – 129(12). – doi: 10.1111/jam.14511
 29. Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. / R. Nyanzi, M. D. Awouafack, P. Steenkamp et al. // Food Chemistry. – 2014. – 164. – P. 470–475.
 30. Wannun P. Purification, characterization, and optimum conditions of fermentin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11 / P. Wannun, S. Piwat, R. Teanpaisan // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2016. – 179. – P. 572–582. – doi: 10.1007/s12010-016-2014-y
 31. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: An update / F. C. Ribeiro, R. D. Rossoni, P. P. De Arros et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – 129(12). – doi:10.1111/jam.14511
 32. Santos C. T. Antifungal and Antivirulence Activity of Vaginal *Lactobacillus* spp. Products against *Candida* Vaginal Isolates / C. T. Santos // Pathogens. – 2019. – Sep. 8(3): 150. – doi:10.3390/pathogens8030150
 33. Muizzuddin N. Physiological effect of a probiotic on skin / N. Muizzuddin // Journal of Cosmetic Science. – 2012. – 63(6). – P. 385–395.
 34. Kawahara T. Effect of *Lactobacillus* strains on thymus and chemokine expression in keratinocytes and development of atopic dermatitis-like symptoms / T. Kawahara, N. Hanzawa, M. Sugiyama // Benef Microbes. – 2018. – 9(4). – P. 643–652. – doi: 10.3920/BM2017.0162
- Reference**
1. Parsool N., Rampai P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli* – infected T84 cells. Research in Microbiology. 2005.156: 256–262. doi: 10.1016/j.resmic.2004.09.013
 2. Bedi DA, Feizizadeh S, Jafarian-Dehkordi A. *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli*. Res Pharm Sci. 2013.4: 260–268.
 3. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JL. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. Science. 2005.307:1915–1920. 10.1126/science.1104816
 4. Collado Maria C., Isolauri Erika, Salminen Seppo. Specie probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. FEMS Microbiol Lett. 2008. 285: 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x>
 5. Prince T, McBain Andrew J and O'Neill Catherine A. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus Aureus* Induced Cell Death by Competitive Exclusion. Appl. Environ. Microbiol. 2012. 15:78–51 19. 10.1128/AEM.00595-12
 6. Maudsdotter L, Jonsson H, Roos S, AB Jonsson. *Lactobacillus* reduce Cell Cytotoxicity Caused by *Streptococcus pyogenes* by Producing Lactic Acid that Degrades the Toxic Component Lipoteichoic Acid. Antimicrob. Agents Chemother. 2011. 55:1622–88. <https://doi.org/10.1128/AAC.00770-10>
 7. Gholami A., Dabbaghmanesh M. H., Ghasemi Y., Talezadeh P., Koohpeyma F., and Montazeri-Najafabady N. Probiotics ameliorate pioglitazone-associated bone loss in diabetic rats. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2020.Vol. 12, no. 1. 10.21203/rs.3.rs-32789/v2
 8. Montazeri-Najafabady N., Ghasemi Y., Dabbaghmanesh M. H., Talezadeh P., Koohpeyma F. and Gholami A. Supportive role of probiotic strains in protecting rats from ovariectomy-induced cortical bone loss. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2019.Vol. 11, no. 4, pp. 1145–1154. 10.21203/rs.3.rs-32789/v1
 9. Tsiouris C. G. and Tsiouri M. G. Human microflora, probiotics and wound healing. Wound Medicine. 2017. Vol. 19, pp. 33–38. 10.1016/j.wndm.2017.09.006
 10. Zhu Jianwei, Gong Liu Shengjie, Hongyan, and Yu Hansong. Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods. Research Article. V. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5416725>
 11. Stefano Nebbia, Cristina Lamberti, Giuliana Lo Bianco, Simona Cirrincione, Valerie Laroute, Muriel Coccagn-Bousquet, Laura Cavallarin, Maria Gabriella Giuffrida, and Enrica Pessione. Antimicrobial Potential of Food Lactic Acid Bacteria: Bioactive Peptide Decryption from Caseins and Bacteriocin Production. Microorganisms. 2021. Jan; 9(1): 65. 10.3390/microorganisms9010065
 12. Engels C, Schwab C, Zhang J, Stevens MJ, Bieri C, Ebert MO, McNeill K, Sturla SJ, Lacroix C. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. Sci Rep. 2016. Nov 7; 6(1):36246.
 13. Toba T., Samant S.K., Yoshioka E., Itoh T. Reuterin, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. Lett. Appl. Microbiol. 1991;13:281–286. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00629.x.
 14. Gänzle MG, Hölzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Appl Environ Microbiol. 2000. Oct; 66(10):4325–33
 15. Lamberti C., Genovese F., Coisson J.D., Bianco G.L., Coccolin L., Pessione E. Anti-S. aureus and Anti-L. Monocytogenes Molecules Produced by Cheese-Isolated Lactic Acid Bacteria. Czech J. Food Sci. 2014. 32:7. doi: 10.17221/505/2012-CJFS
 16. Van Heijenoort J. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. Microbiol Mol Biol Rev. 2007. Dec; 71(4):620–35
 17. Zacharof M.P., Lovitt R.W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. APCBEE Procedia. 2012. 2:50–56. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010
 18. Nishie M, Nagao J, Sonomoto K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Sci. 2012. Mar; 17(1):1–16
 19. Guinane CM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. FEMS Microbiol Lett. 2006. Jul; 260(1):77–83.
 20. Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. Molecules. 2017. Jul 26; 22(8)
 21. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microb Cell Fact. 2014. Aug 29; 13 Suppl 1():S3.
 22. Sichel L, Timoshok NA, Pidgorsky VS, Spivak NY Study of Interferonogenous Activity of the New Probiotic Formulation Del-ImmuneV®. J Prob Health. 2013. 1: 107. doi: 10.4172/2329-8901.1000107, Sichel L, Timoshok NA, Pidgorsky VS, Spivak NY (2013) Study of Interferonogenous Activity of the New Probiotic Formulation Del-Immune V®. J Prob Health 1: 107. – doi: 10.4172/2329-8901.1000107
 23. Pidgorsky V.S., Shynkarenko-Sichel L.N., Timoshok N.A., Chepesh A.V., Spivak N.Y. Effects of dry enzymatic lysate Del-immune V® on cytokine production in the experimental models. Microbiology & Biotechnology. 2011. N3:23–36. – https://www.researchgate.net/profile/Victor-Barshteyn/publication/235963325_CONTENT_OF_MYCELIAL_BIOMASS_AND_CULTURE_LIQUID_OF_CORDYCEPS_SINENSIS_BERK_SACC_ASCOMYCETES/links/0c960516e9c8d63749000000/CONTENT-OF-MYCELIAL-BIOMASS-AND-CULTURE-LIQUID-OF-CORDYCEPS-SINENSIS-BERK-SACC-ASCOMYCETES.pdf
 24. Pirog T., Shevchuk T., Voloshina I., Gregirchak N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. Applied Biochemistry and Microbiology. 2005. Vol. 41, No. 1. – P. 51–55. <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/613>
 25. Evera Pingitore, Salvucci E, Sesma F, Nader-acias MA. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB) . Lett. Appl. Microbiol.2007. 46:174 – 180- www.researchgate.net/publication/237411008_Different_strategies_for_purification_of_antimicrobial_peptides_from_Lactic_Acid_Bacteria_LAB
 26. Peral C, Huaman Martinez MH, Valdez CJ. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in bums. International Wound Journal. 2009b. 6:73–81
 27. Peral MC, Rachid MM, Gobbato MN, Martinez MH, Valdez JC. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. Clin. Microbiol. Infect. 2009a.16:281–286
 28. Ribeiro F.C., Rossoni R.D., De Arros P.P., Santos J.D., Fugisaki L.R.O., Leão M.P.V., Junqueira J.C. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: An update. Journal of Applied Microbiology. 2019.129(12). 10.1111/jam.14511
 29. Nyanzi R., Awouafack M.D., Steenkamp P., Jooste P.J., Eloff J.N. Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. Food Chemistry. 2014.164 pp. 470–475

30. Wannun P., Piwat S., Teanpaisan R. Purification, characterization, and optimum conditions of fermentin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11 Applied Biochemistry and Biotechnology. 2016.179, pp. 572-582. 10.1007/s12010-016-2014-y

31. Ribeiro F.C., Rossoni R.D., De Arros P.P., Santos J.D., Fugisaki L.R.O., Leão M.P.V., Junqueira J.C. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: An update. Journal of Applied Microbiology. 2019.129(12). 10.1111/jam.14511

32. Santos C.T., et al. Antifungal and Antivirulence Activity of Vaginal *Lactobacillus* spp. Products against *Candida* Vaginal Isolates. Pathogens. 2019.Sep; 8(3): 150. 10.3390/pathogens8030150

33. Muizzuddin N. Physiological effect of a probiotic on skin. Journal of Cosmetic Science. 2012.63 (6), pp. 385-395

34. Kawahara T., Hanzawa N., Sugiyama M. Effect of *Lactobacillus* strains on thymus and chemokine expression in keratinocytes and development of atopic dermatitis-like symptoms. Benef Microbes 2018. 9 (4) pp. 643-652, 10.3920/BM2017.0162

Надійшла до редколегії 28.09.2022

Отримано виправлений варіант 28.10.2022

Підписано до друку 28.10.2022

Received in the editorial 28.09.2022

Received version on 28.10.2022

Signed in the press on 28.10.2022

D. Ostapchenko¹, Stud.,
O. Korotkyi¹, Dr. Hab.,
O. Tsyryuk¹, Dr. Hab.,
Yu. Penchyk¹, PhD,
L. Sichel², Chief Researcher²

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

²Stellar Biotics, LLC Niwot, Colorado, USA

ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* LYSATE

According to World Health Organization, antibiotic resistance is rising to dangerously high levels in all parts of the world. New resistance mechanisms are emerging and spreading globally, threatening our ability to treat common infectious diseases. Therefore, searching for new antimicrobial agents of natural origin is an extraordinary global problem.

The work aimed to determine the antimicrobial activity of lyophilized enzymatic lysate of cells of the *Lactobacillus rhamnosus* V strain of lactic acid bacteria.

The object of the study was the drug Del-Imun V®, which has anti-allergic and immunostimulating activity. The researchers' efforts aimed to fully reveal the drug's potential, particularly its antimicrobial action.

Antimicrobial activity was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC). Determination of MIC was carried out by the method of two-time serial dilutions in meat-peptone broth (MPB) for bacteria and liquid wort for yeast. Gram-negative (*Escherichia coli* IEM-1, *Proteus vulgaris* PA-12, *Pseudomonas* sp. MI-2) and Gram-positive (*Bacillus subtilis* BT-2, *Staphylococcus aureus* BMC-1) bacteria, as well as yeast (*Candida albicans* D-6, *Candida tropicalis* PE-2, *Candida utilis* BVS-65).

It was shown that MIC values of the native preparation for the bacterial test cultures (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2, *Staphylococcus aureus* BMC-1, *Proteus vulgaris* PA-12, *Pseudomonas* sp. MI-2) were 8 times slower, than those of the thermally inactivated preparation, for the yeasts (*Candida albicans* D-6, *Candida tropicalis* PE-2, *Candida utilis* BVS-65) – 4-8 times slower.

As a result of the conducted research, the antibacterial and antifungal activity of the drug Del-Imun V® was established. The spectrum of antimicrobial activity concerned gram-positive and gram-negative bacteria and yeast-like fungi of the genus *Candida*. The minimum inhibitory concentrations were quite low: from 1.0 to 4.0 µg/ml for bacterial cultures and from 62.5 to 125 µg/ml for yeast. The culture of *B. subtilis* BT-2 was the least sensitive to the drug's action (MIC – 12.5 µg/ml).

Therefore, it can be concluded that the lysate of *Lactobacillus rhamnosus* V lactic acid bacteria has antibacterial and antifungal properties.

Keywords: bacterial lysate, probiotic, lactic acid bacteria, antimicrobial activity.