

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА**

**ЛАВРИК ГАЛИНА СТЕФАНІВНА**

УДК: 579.864.017:579.26:(579.61:616-092].041/.042

**ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАЦИЛ ЗА  
ВЗАЄМОДІЇ З АВТОХТОННОЮ І ПАТОГЕННОЮ МІКРОБІОТОЮ  
*IN VIVO* ТА *IN VITRO***

03.00.07- мікробіологія

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Одеса – 2020**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**КОРНІЙЧУК ОЛЕНА ПЕТРІВНА**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького  
завідувач кафедри мікробіології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Вінніков Альберт Іванович**  
Дніпровський національний університет  
імені Олеся Гончара  
професор кафедри  
загальної медицини з курсом фізичної терапії

кандидат біологічних наук,  
**Галкін Микола Борисович**  
доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Захист дисертації відбудеться "16" жовтня 2020 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.051.06 Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за адресою: 65058, м. Одеса, пров. Шампанський, 2.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за адресою: 65001, м. Одеса, вул. Преображенська, 24.

Автореферат розісланий "16" вересня 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої Вченої ради  
кандидат технічних наук, доцент



Г. В. Ямборко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Останніми десятиліттями на тлі розвитку мікроекології як важливої наукової галузі медицини та біології значно розширюються і подекуди переглядаються питання функціональної значущості та взаємодії з макроорганізмом нормальної мікробіоти організму людини. Біоценози всіх біотопів нерозривно пов'язані між собою і зміни в одному з них закономірно поширюється на всі локуси мікроекологічної системи [Полуэктова Е. А. и др., 2014; Савченко Т. Н. и др., 2011], що є результатом природного відбору під час коеволуції між мікробною спільнотою і людським організмом [Walter J., 2008; Ley R. E. et al., 2006].

Фізіологічно цінним облігатним компонентом різних екосистем людського організму (травного, уrogenітального трактів та ротоглотки) є лактобацили. Спектр функцій лактобацил різноманітний: біосинтетична (продукція органічних кислот, перекису водню, лізоциму, бактеріоцинів, біосурфактантів, багатоатомних спиртів, газів) [Dworkin M. et al., 2006; Dobson A. et al., 2012], колонізаційна (конкуренція за лімітовані поживні субстрати та сайти адгезії з патогенами), ферментативна (метаболізм білків, жирів, вуглеводів, жовчних кислот, гормонів), імуномодулююча, детоксикаційна, моторна та ін. [Шумилов П. В., 2010; Bauer E. et al., 2006].

Формування *Lactobacillus spp.* приепітеліальних мікробіоценозних біоплівок створює потужний біологічний бар'єр, який попереджає колонізацію епітелію патогенними мікроорганізмами і забезпечує збереження власної мікробіоти в природних біотопах організму людини [He X. et al., 2011].

Особливу увагу привертають і умовно-патогенні бактерії, які, формуючи біоплівкову структуру, спричиняють запальні процеси, що важко піддаються лікуванню. Серед них стафілокок є основною причиною розвитку персистуючих, хронічних гнійно-запальних інфекцій [Otto M., 2009; Гостев В. В. и др., 2010].

Одним із способів підвищення ефективності протимікробної терапії захворювань, спричинених стафілококами, є застосування засобів, які б дали змогу дезінтегрувати біоплівку для переведення патогена у планктонну форму. Для цього застосовують мікроорганізми-антагоністи у складі еубіотичних препаратів, зокрема, лактобацили [Nair N. et al., 2014].

Останніми роками спостерігається ріст захворювань, що супроводжуються дисбіотичними змінами. Спектр захворювань досить широкий - від аутоімунних і запальних захворювань травного тракту, підшлункової залози, нирок, печінки до анемії, метаболічного синдрому та сепсису. Дисбіози сприяють розвиткові цукрового діабету, алергічних та шкірних захворювань [Pflughoeft K. J. et al., 2012; Saulnier D. M. et al., 2011; Sha S. et al., 2014; Alonso V. R. et al., 2013; Mozaffari N. B. et al., 2015; Cavalcante-Silva L. H. A. et al., 2015; Bajaj J. S. et al., 2011; Manzo V. E. et al., 2015; Donath M. Y. et al., 2011; Penders J. et al., 2007; et al., 2014; Конев Ю. В., 2005; Shreiner A. et al., 2008; Вус М. et al., 2009]. При цьому в кишковому і вагінальному біотопах помітно знижується популяційний рівень індигенних цукролітичних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* [Войда Ю. В. и др., 2012, Анохин В. А. и др., 2001].

Впродовж останніх десятиліть фармацевтичний ринок України значно поповнився широким асортиментом біопрепаратів – різних за складом та

призначенням. Нові дані щодо несумісності [Глушанова Н. А. и др., 2005] екзогенних штамів бактерійних препаратів з автохтонною мікробіотою стали підґрунтям для дослідження даного аспекту.

Таким чином, у багатьох питаннях мікробіоценозів та біотерапії, які останніми десятиліттями зайняли належне місце у практичній медицині, вченими не досягнуто єдиної думки щодо можливих ризиків застосування препаратів, які містять живі мікроорганізми, а також в аспектах, що стосуються взаємодії імплантованих пробіотичних мікроорганізмів з представниками автохтонної мікробіоти.

Оскільки, за результатами низки досліджень [P. Arck et al., 2010; Benyacoub J. et al., 2013; Vowe W. P., 2013] доведено позитивний вплив пробіотиків на мікробіом шкіри, який задіяний до підтримки її гомеостазу, було доцільним детальне вивчення модулюючого впливу на стафілококовий компонент мікробіома шкіри препаратів лактобацил.

Тому дослідження взаємодії і впливу лактобацил на інші бактерії є важливим для обґрунтування та розробки комплексної антимікробної терапії.

**Зв'язок роботи з державними і галузевими науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом запланованих науково-дослідних робіт кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького за темами: «Розробка диференційованої тактики лікування і профілактики моно- та поліорганної недостатності в ургентній абдомінальній хірургії» № державної реєстрації: 0110U002149, шифр: ІН.2100.0002.10. (2010-2014 рр.), «Обґрунтування моніторингу діагностики, стратегія профілактики та стандартизація методів лікування кровотеч (шлунково-кишковий тракт) № державної реєстрації: 0115U000042, шифр: ІН.21.00.001.15. (2015-2019 рр.) та фінансованої теми з державного бюджету України «Скринінг вторинних метаболітів стрептоміцетів, активних щодо полірезистентних збудників нозокомінальних інфекцій» (2018-2020 рр.).

Автор дисертації виконувала фрагменти перерахованих тем, які стосуються теми дисертаційного дослідження.

**Мета і завдання дослідження.** *Мета* - порівняльна характеристика біологічних властивостей лактобацил - ізолятів різних екосистем організму людини - і встановлення характеру їхньої взаємодії із мікробними чинниками за умов запального процесу та індигенними та пробіотичними штамми лактобацил.

Для досягнення вказаної мети поставлено такі завдання:

1. Встановити видовий спектр лактобацил – нормосимбіонтів природних екосистем людського організму – травного, уrogenітального трактів та ротоглотки.
2. Встановити біологічні властивості лактобацил, що входять до складу мікробіоценозів організму людини (ступінь резистентності до протимікробних хіміотерапевтичних препаратів, адгезивні властивості та антагоністична активність).
3. Встановити характер взаємодії індигенних лактобацил із штамми лактобацил - складників еубіотиків *in vivo* (за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу).
4. Встановити здатність лактобацил формувати біоплівкові структури *in vitro*.

5. Встановити характер взаємодії лактобацил і стафілококів у змішаних плівкоутворювальних культурах та виявити ультраструктурні зміни в клітинах вказаних систем.

6. Розробити заходи з підвищення ефективності біокорегуючої терапії з урахуванням видового складу лактобацилярних компонентів біопрепаратів.

**Об'єкт дослідження:** лактобацилярна мікробіота травного, урогенітального трактів і ротоглотки практично здорових осіб та її роль у формуванні відповідних мікробіоценозів та шляхів їх стабілізації за умов дисбіотичних змін.

**Предмет дослідження:** біологічні властивості бактерій роду *Lactobacillus* та характер взаємодії аутохтонної лактобацилярної мікробіоти із пробіотичними штамами лактобацил та мікроорганізмами - чинниками запального процесу.

**Методи дослідження:** *мікробіологічні* - виділення, ідентифікація та визначення біологічних властивостей мікросимбіонтів людського організму (мікроскопічні, культуральні, біохімічні властивості досліджуваних ізолятів лактобацил; вивчення антагоністичної активності та адгезії; визначення чутливості до протимікробних препаратів; *спектрофотометричні, електронно- та флуоресцентно-мікроскопічні* (дослідження біоплівки); *біологічні* –експериментальне моделювання антибіотикоасоційованого дисбактеріозу у мишей та вивчення динаміки відновлення мікробіоти кишечника; *статистичні* дослідження.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Доповнено новими даними уявлення щодо видового спектра бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з різних екосистем людського організму, їхньої біологічної активності, та антибіотикочутливості.

Зафіксовано дисоціацію за морфологічними та культуральними властивостями у культурах *L. rhamnosus*, що виділялися від осіб з ознаками дисбіотичних порушень, що супроводжувалась також незначною альтерацією біохімічних властивостей (ферментація арабінози та незброджування меліцитози).

Вперше запропоновано використання для культивування і зберігання бактерій роду *Lactobacillus* поживне середовище на основі ячмінного солоду.

Вперше встановлено взаємозв'язок між чутливістю до протимікробних препаратів ізолятів лактобацил та мікробіотою відповідно до ніш, які вони заселяють.

За умов антибіотикоасоційованого дисбактеріозу за результатами експериментального дослідження доведено більш високу ефективність застосування біокорегуючих препаратів для відновлення лактобацилярної мікробіоти в порівнянні з використанням аутоштамів лактобацил.

Вперше встановлено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro* до плівкоутворення, а також показано набуття здатності лактобацил до росту на глюкозному агарі (1%) за аеробних умов після виділення їх у змішаних культурах з біоплівкоутворювальними стафілококами.

Вперше показано зміни ультраструктури стафілококів, спричинені активністю пробіотичних штамів лактобацил, і доведено їх незворотність. Натомість індигенні лактобацили здатні лише індукувати перехід стафілококів у стан спокою. Доведено, що антагоністична активність лактобацил індукується біоплівкоутворювальними стафілококами.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані дали змогу диференційовано охарактеризувати спектр лактобацилярної нормосимбіотичної мікробіоти відповідно до функціональної активності у природних біосистемах організму людини.

Визначено чутливість лактобацил до протимікробних препаратів та доцільність застосування відповідних еубіотиків у залежності від їх складу, призначення та від протимікробного засобу при проведенні відповідної антимікробної терапії. Доцільно включати пробіотичні штами лактобацил у засоби місцевого застосування при лікуванні вугрової хвороби.

Встановлено підвищення ефективності лікування *acne vulgaris* за умов комбінування медикаментозного лікування та біокорекції із застосуванням препаратів лактобацил, що дає змогу оптимізувати схему лікування і зменшити навантаження антимікробними хіміотерапевтичними засобами.

**Впровадження у практику.** За результатами роботи розроблено два патенти на корисну модель «Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus*» (патент України № 100849 від 10.08.2015р.), «Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus*» (патент України № 100850 від 10.08.2015р.).

Результати дослідження впроваджені у наукову роботу кафедр вищих медичних навчальних закладів України: Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Буковинського державного медичного університету, Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

**Особистий внесок здобувача.** Автором дисертаційної роботи самостійно проведено патентно-інформаційне дослідження, проаналізувано наукову літературу за обраною темою. Дисертантом за участі наукового керівника, завідувача кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького, доктора медичних наук, професора Корнійчук Олени Петрівни сформульовано мету, завдання та методи дослідження. Збір матеріалу, формування груп для досліджень, планування та проведення експериментів автором здійснено самостійно. Мікробіологічні дослідження проведені автором власноруч на базі кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького.

Особисто проведено статистичну обробку і аналіз отриманих результатів, їхню інтерпретацію з використанням даних наукової літератури. Самостійно проведено підготовку матеріалів та оформлення дисертації. Формулювання висновків та практичних рекомендацій проведено за участі наукового керівника, завідувача кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького, доктора медичних наук, професора Корнійчук Олени Петрівни.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих працях вказано за текстом дисертації та в авторефераті у списку фахових публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Результати та основні наукові положення дисертаційної роботи було представлено, обговорено та позитивно оцінено на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу» (Львів, 2013, 2015 рр.); XIII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (Ялта, 2013); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (Вінниця,

2014 року); науково-практичній конференції «Довкілля та здоров'я» (Тернопіль, 2015); VIII міжнародної науково-практичної конференції «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2015); міжнародній науковій конференції «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології» (Львів, 2016).

Дисертація апробована на спільному засіданні кафедри мікробіології, науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць (2 - одноосібно). Серед них 10 статей у провідних наукових фахових виданнях України рекомендованих ДАК України (2 статті опубліковані у журналах, які представлені в Web of Science, 2 статті в журналі з індексом Scopus, 2 статті в журналі з індексом РИНЦ), 2 патенти України на корисну модель, 4 тез у матеріалах міжнародних з'їздів та науково-практичних конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Робота викладена на 189 сторінках комп'ютерного тексту та складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел містить 333 (з них 254 іноземних авторів). Матеріали дисертації ілюстровані 10 таблицями та 43 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

**В огляді літератури** висвітлено сучасні уявлення щодо ролі бактерій роду *Lactobacillus* у функціонуванні мікробіоценозів, формуванні ними біоплівкових структур. Проаналізовано сучасний стан щодо нових принципів клінічного застосування живих мікроорганізмів для мінімізації ризику побічних ефектів.

**Матеріали та методи досліджень.** Обстежено 378 осіб, з них 309 - практично здорових, від яких було забрано матеріал з ротоглотки, кишечника, піхви для дослідження мікробіоти і виділення бактерій роду *Lactobacillus*. Решта обстежених були 69 осіб, хворих на *acne vulgaris*, у яких забирався вміст з гнійних пустул.

Мікробіологічна діагностика включала мікроскопічний, культуральний, біохімічний методи дослідження. Для визначення родової і видової приналежності лактобацил використовували стандартні середовища MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) та біохімічні тест-системи API-20 A (bioMérieux SA, Франція) згідно з інструкцією виробника.

Антагоністичну активність ізольованих штамів лактобацил вивчали за допомогою методу відтермінованого антагонізму за Фредеріком.

Адгезивні властивості лактобацил визначали на клітинах букального епітелію людини та еритроцитах 0 (1) групи крові за методами (Брилис В. И. и др., 1986; Осолодченко Т. П., 2009).

Для дослідження чутливості лактобацил до протимікробних препаратів використовували диско-дифузійний метод.

Моделювання експериментального антибіотикоасоційованого дисбіозу проводили на білих безпородних мишах-самцях (n=27), яким вводили доочеревино лінкоміцин та ципрофлоксацин з розрахунку на 1 кг маси впродовж трьох днів.

Після введення антибіотиків мишей (n=27) поділили на чотири групи, яким до основного харчового раціону додавали: першій групі мишей (контроль, n=6) - стерильний фізіологічний розчин; другій групі (n=7) - автоштами лактобацил; третій (n=7) - пробіотичні штами лактобацил пробіотиків; четвертій (n=7) - суміш авто- та пробіотичних штамів лактобацил, n=7 (1:1). Забір фекалій для оцінки мікробіоти проводили (4 рази) до- і після введення антибіотиків, після 10-денної біокорекції та через 13 днів (період відновлення).

Дослідження на лабораторних тваринах проведені з дотриманням принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Здатність до біоплівкоутворення у лактобацил та стафілококів визначали спектрофотометрично, а також за допомогою інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст – DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії. Біоплівки вирощували на стерильних покривних скельцях і використовували подвійне прижиттєве фарбування за допомогою флуоресцентних барвників Hoechst-33258 та пропідіум йодид (PI) для виявлення життєздатних/мертвих клітин. Біоплівки лактобацил і стафілококів формували як у моно-, так і змішаній культурі.

Для вивчення ультраструктурних змін біоплівкоутворювальних стафілококів під впливом лактобацил використовували трансмісійну електронну мікроскопію (ТЕМ).

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначали у стафілококів присутність генів біоплівкоутворення *icaA* та *icaD*.

Бактеріоцинну активність досліджуваних штамів лактобацил щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* вивчали методом дифузії в агар (Zhang H. et al., 2013), використовуючи нативні бактеріальні культури лактобацил (НБК), їхні відфільтровані надосадові рідини лактобацил (ВНР) та нейтралізований супернатант (НС).

У дослідженні були передбачені заходи стосовно безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів і наказів Міністерства охорони здоров'я України. Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 8 від 21.10.2019 р.) встановлено, що порушень морально-етичних норм під час проведення досліджень не виявлено.

Отримані результати надавали статистичній обробці за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням пакета програм MS Excel.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати власних досліджень викладено у третьому-сьомому розділах. В результаті бактеріологічних досліджень вивчено видовий спектр лактобацилярної мікробіоти природних екосистем людського організму. Встановлено, що лактобацили виділяються у різних відсоткових частках у залежності від природної екосистеми: найбільший відсоток - з ротоглотки (81,1 %), 62,5 % - з травного тракту і найменша кількість - 45 % - з



вагіни. Встановлено домінування у всіх екологічних нішах виду *L. acidophilus* (30,3 %). Видовий спектр усіх біотопів включав *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum* і *L. rhamnosus*, лише *L. helveticus* (6,9 %) та *L. gasseri* (4,2 %) висівалися з вагінального тракту. У всіх екосистемах переважали гетероферментативні лактобацили, що пов'язано із здатністю зброджувати вуглеводи гліколітичним і пентозофосфатним шляхами.

Зафіксовано дисоціацію штаму *L. rhamnosus* (S-форма, R- форма) за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями у пацієнта з частими дисбіотичними розладами. Дисоціант *L. rhamnosus* (R-форма) втратив здатність утилізувати олігосахариди (меліцитоза), проте набув властивість ферментувати арабінозу.

У зв'язку з низькою частотою виділення лактобацил з вагінального секрету проведено більш детальний аналіз мікробіоти піхви. У 55 % практично здорових жінок з вагінального секрету не виділено лактобацил, що свідчить про поширеність мікробіологічних порушень серед осіб репродуктивного віку.

При вивченні антагоністичної активності лактобацил, встановлено, що пробіотичні штами *L. plantarum* P17630, *L. acidophilus* KS 400, *L. plantarum* 8R-A3 спричиняють виражене пригнічення росту умовно-патогенних бактерій. *L. plantarum* 8R-A3 проявив найвищу антагоністичну активність відносно грамнегативних бактерій клінічних ізолятів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Найвищу протигрибкову активність встановлено для *L. plantarum* P17630: зона затримки росту *C. albicans*, виділених з піхви практично здорових жінок становила  $37,89 \pm 0,76$  мм, а від хворих з кандидозним вульвовагінозом - *L. plantarum* P17630  $34,85 \pm 1,09$  мм ( $p > 0,05$ ).

Лактобацили, виділені від практично здорових жінок, проявляють деяку антагоністичну активність лише відносно *C. albicans* (зона затримки росту -  $12,04 \pm 0,37$  мм), проте є неактивними у жінок з проявами вульвовагінального кандидозу. Відносно видів *C. non-albicans* антагонізму не виявлено.

При вивченні адгезивних властивостей лактобацил найвищі показники адгезивності (індекс адгезивності - ІАМ) до клітин людського організму встановлено для *L. acidophilus* ротоглотки ( $4,12 \pm 0,07$ ) та вагіни *L. plantarum* ( $4,36 \pm 0,22$ ). Найвищий показник адгезії для ізолятів травного тракту встановлено для виду *L. casei* ( $4,66 \pm 0,04$ ) відносно клітин букального епітелію. Пробиотичні штами *L. plantarum* 8R-A3, *L. acidophilus* KS 400, *L. reuteri* DSM 17938 до букального епітелію виявилися високоадгезивними. Індекс адгезивності лактобацил до людських еритроцитів I (0) групи крові є значно нижчим, ніж до букального епітелію ( $p < 0,001$ ), що, вірогідно, пов'язане з характером поверхні і з більшими розмірами епітеліальних клітин.

Підсумовуючи дані щодо антагоністичних та адгезивних властивостей, можна відзначити, що вони є більшою мірою штамовою ознакою, ніж видовою.

Можливість одночасного застосування пробіотиків з протимікробними препаратами вимагає наявності у них резистентності до відповідних антибіотиків. Встановлено відмінності чутливості до протимікробних препаратів культур лактобацил, виділених з різних екосистем людського організму. Ротоглотковим ізолятам лактобацил властива чутливість до протимікробних препаратів, яка є характерною більшою мірою для грампозитивної мікробіоти, що заселяє зів, а

частина кишкових ізолятів чутлива до препаратів (аміноглікозида, тетрацикліни), які є активними, зазвичай, для представників ентеробактерій, що може бути непрямим свідченням міжвидового обміну генетичним матеріалом серед представників однієї екологічної ніші. Відмічено більш високі показники чутливості до фторхінолонів кишкових ізолятів лактобацил, порівняно із ротоглотковими.

Отже, отримані результати дають підставу припустити наявність відмінностей у біологічних особливостях, і зокрема, рецепторному апараті лактобацил, висіяних із ротоглотки, кишечника, вагіни, що важливо для розуміння процесів взаємодії молекули хіміотерапевтичного препарату з бактеріальною клітиною.

У 5,4% лактобацил встановлено чутливість до протигрибкових препаратів, зокрема клотримазолу, що вказує на важливість проведення мікробіологічного дослідження з визначенням чутливості до дії різних протигрибкових препаратів індигенної вагінальної мікробіоти за наявності клінічних симптомів кандидозної інфекції

За допомогою змодельованого експериментального дисбактеріозу у лабораторних тварин проаналізовано характер змін складу кишкової мікробіоти, а також проведено оцінку як самостійного відновлення індигенної мікробіоти, так і за участі пробіотичних штамів лактобацил. Отже, відновлення вихідних кількісних рівнів лактобацил та біфідобактерій у складі мікробіоценозу кишечника було досягнуто лише у відновний період серед мишей (контрольна 1-а група), яким не згодували біопрепарати (спонтанне відновлення) та за умов використання аутоштамів лактобацил (2-а група), що свідчить про чужорідність (гетерологічності) індигенних штамів лактобацил після культивування на штучному поживному середовищі (рис.1). Процес відновлення нормобіоценозу серед тварин обох груп практично не відрізнявся.

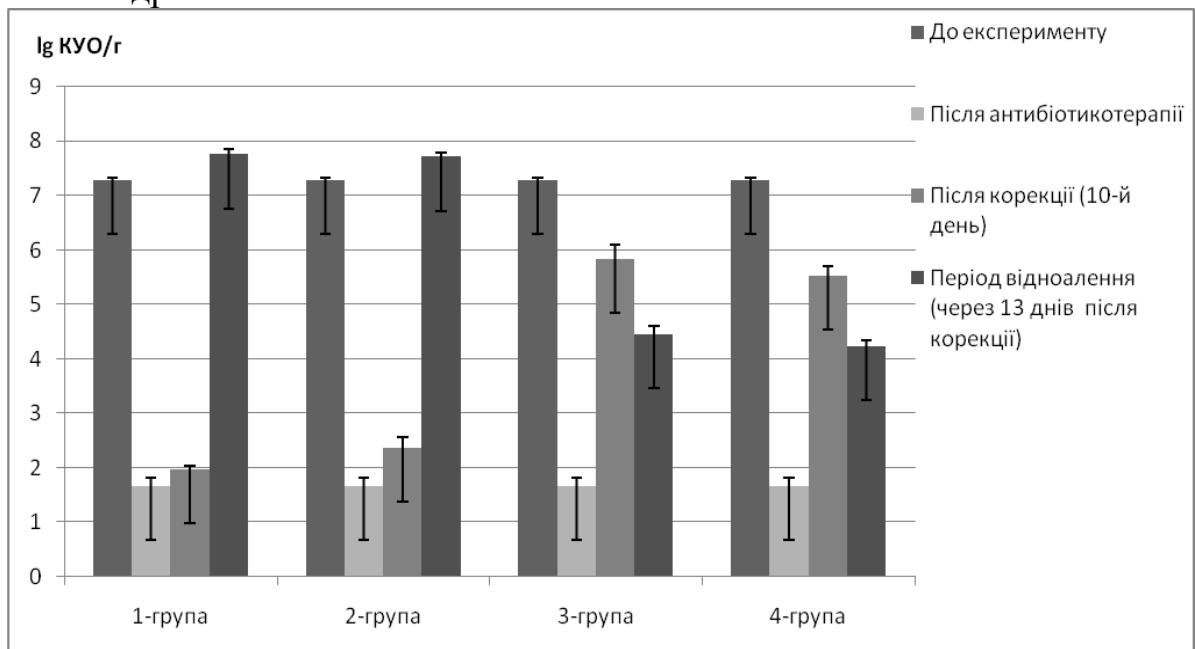


Рис. 1. Кількісні рівні *Lactobacillus spp.* кишечника мишей у різні періоди експерименту за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу

Використання для корекції мікробіоти пробіотичних штамів (3-а група), а також згодування суміші індигенних та пробіотичних штамів (4-а група) було недостатнім для досягнення кількісного рівня *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium*

*spp.* вихідних значень, що можна трактувати як конкуренцію між пробіотичними та індигенними лактобацилами. Причому у групі тварин, яким проводили корекцію пробіотичними штамами, спостерігалось переважання показника маси тіла в кінці експерименту у порівнянні з вихідними значеннями.

Останніми роками низьку ефективність протимікробної терапії багатьох хронічних захворювань пояснюють утворенням мікроорганізмами біоплівкових форм. Вивчення взаємодії бактерій у біоплівці, утвореній змішаною культурою – стафілококами, виділеними з гнійних пустул хворих на *acne vulgaris*, та лактобацилами проводили за допомогою інтерференційної (DIC) та флуоресцентної мікроскопії. Вперше досліджено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 (48-годинної монокультури) в умовах *in vitro* формувати біоплівку значної щільності -  $1,79 \pm 0,04$  од. Встановлено, що співвідношення клітин у зеленій/червоній ділянці спектру (життєздатних клітин до мертвих) становить 78/22 %, що забезпечує швидку колонізацію слизових оболонок організму людини, і зупиняє розвиток патологічного процесу, спричиненого стафілококами (рис. 2, АБ). У змішаній культурі молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель біоплівкоутворювальних стафілококів, що показано при моделюванні біоплівки стафілококами, виділеними із гною пустул хворих на *acne vulgaris* (рис.3, АБ).

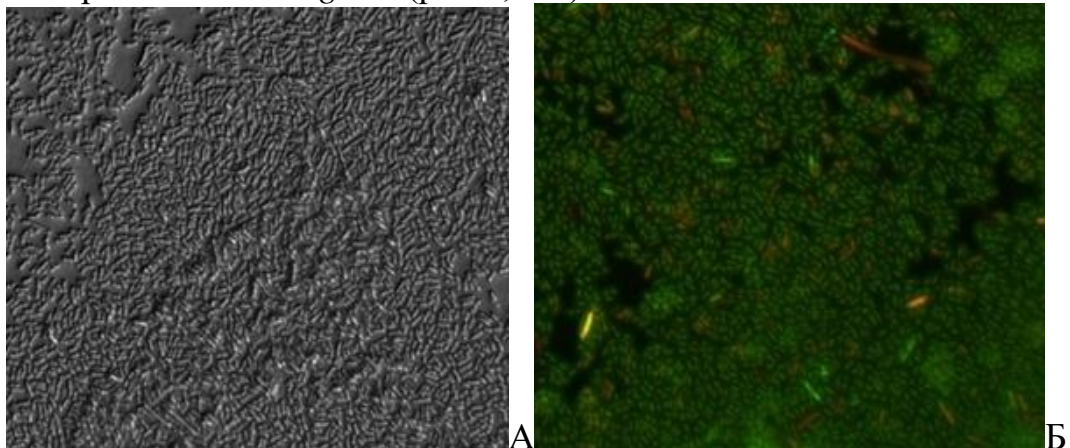


Рис. 2 Біоплівка *L. plantarum* 8R-A3 (монокультура): А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням Hoechst-33258 та PI

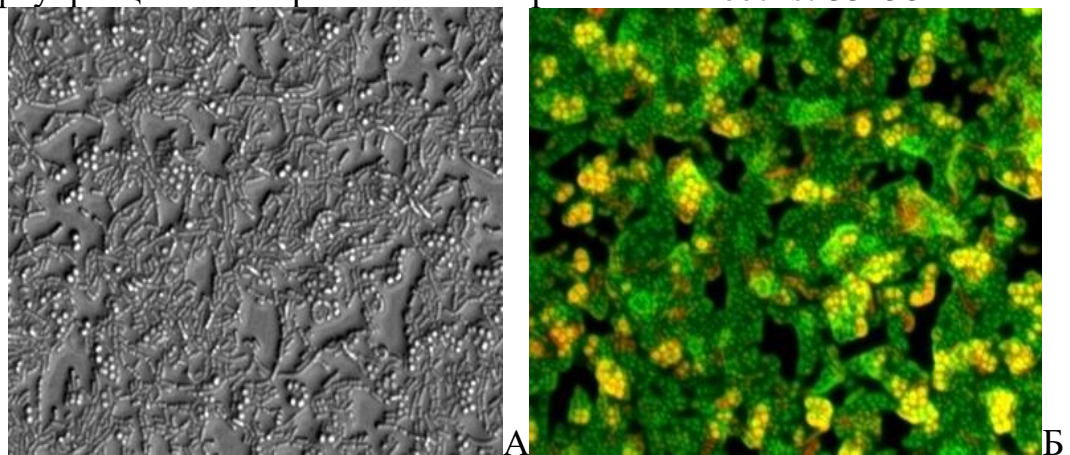


Рис. 3. Біоплівка змішаної культури *L. plantarum* 8R-A3 та *S.aureus* через 48 год: А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням Hoechst-33258 та PI

Визначальним фактором у клінічному перебігу вугрової хвороби є саме здатність бактерій до плівкоутворення.

За допомогою електронної мікроскопії виявлено значні ультраструктурні зміни біоплівкоутворювальних стафілококів у змішаних культурах з лактобацилами. Дестабілізація клітинної стінки виявлялась у її потовщенні, розривах з відтоком клітинного вмісту, у набутті коками неправильної форми, відшаруванні цитоплазматичної мембрани від клітинної стінки та у повному руйнуванні пептидогліканового шару (рис. 4, А-В). Під впливом пробіотичних штамів лактобацил відбувались незворотні зміни в ультраструктурі стафілококів (рис. 4, В), а у змішаних культурах з індигенними ізолятами лактобацил стафілококи набували здатності переходити у стан спокою.

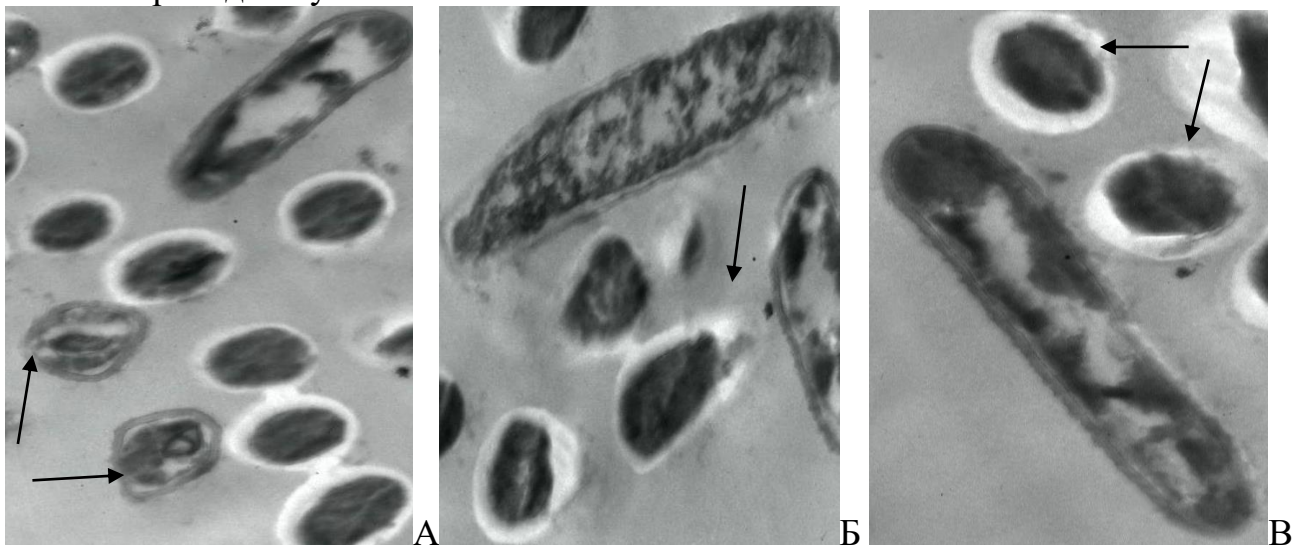


Рис. 4. Мікрофотографії (ТЕМ) змішаних культур стафілококів і лактобацил: А - *L. fermentum* біоплівкоутворююча форма *S. aureus* (збільшення  $\times 6000$ , 15 000); Б - *L. fermentum* і *S. aureus* ATCC 12228 (збільшення  $\times 19\ 000$ ); *L. plantarum* 8R-A3 і плівкоутворююча форма *S. aureus* (збільшення  $\times 15\ 000$ ) (стрілками вказано ультраструктурні зміни клітин стафілококів)

Для підтвердження отриманих результатів (люмінесцентна та електронна мікроскопії) проводили контрольні посіви з біоплівки змішаних культур на поживне середовище, що дало змогу отримати ріст лактобацил (пробіотичних та індигенних ізолятів) на глюкозному агарі (1%) за аеробних умов. Вперше доведено, що у змішаній культурі молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель стафілококів, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну.

Для дослідження здатності до біоплівкоутворення, була використана полімеразна ланцюгова реакція для виявлення відповідних генів у стафілококів (рис. 5, 6). Серед 27 ізолятів *S. aureus* нами виявлено наявність генів *icaA* у 35,71 % штамів, а ген *icaD* – 53,57 %. Проте цей результат не є свідченням того, що решта штамів не є біоплівкоутворювальними, оскільки, паралельно існують механізми формування біоплівки непов'язані з опероном *ica*.

Відібрані 15 ізолятів *S. aureus*, потенційних носіїв генів *ica* локуса, використовували як тест-культури при вивченні бактеріоцидної активності лактобацил.

М 1,2,3а,3b,К,7, 8,10,11,12,14,15,18,19,20 М 21,22,24,25,27,28,29,30,31,32,33,34,35

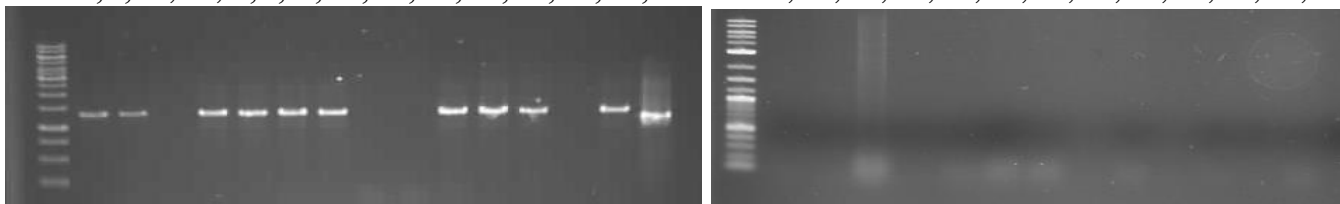


Рис. 5. Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до гену *icaA*: М – маркер молекулярної маси, К – позитивний контроль (ДНК штаму *S. aureus* ATCC 25923), 1-35 - ДНК досліджуваних ізолятів *S. aureus*

1,2, 3а,3b,К,7,8,10,11,12,14,15,18,19,20 М 21,22,24,25,27,28,29,30,31,32,33,34,35

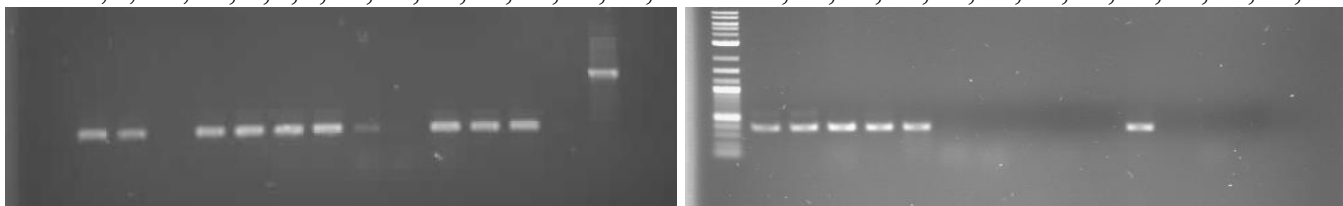


Рис. 6. Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до гену *icaD*: М – маркер молекулярної маси, К – позитивний контроль (ДНК штаму *S. aureus* ATCC 25923), 1-35 - ДНК досліджуваних ізолятів *S. aureus*

При вивченні метаболічних факторів антагоністичної активності лактобацил встановлено індукцію інгібуючої дії нативних культур лактобацил на початку стаціонарної фази їхнього росту через 12 год (рис.7).

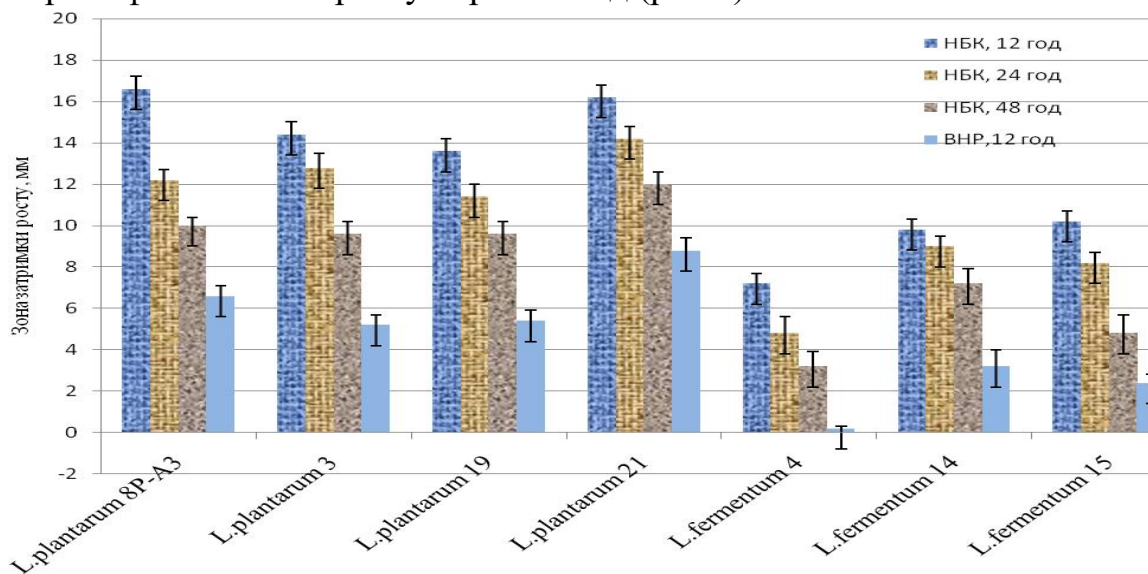


Рис. 7. Антимікробна активність нативних культур лактобацил та їх надосадових рідин відносно біоплівкоутворювальних штамів *S.aureus* (n=15) у залежності від часу їх культивування - 12, 24, 48 год

Найбільшу зону інгібуювання зафіксовано за дії пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 -  $16,6 \pm 0,6$  мм, середню активність виявлено у штама *L. fermentum* 14 -  $7,2 \pm 0,5$  мм. Штами *L. plantarum* 8R-A3 та *L. plantarum* 21 зберегли високу антагоністичну активність і через 48 год культивування.

Фільтрування надосадової рідини лактобацил призвело до різкого зниження їхньої активності, а при нейтралізації цієї рідини 2 н NaOH та каталазою не зафіксовано інгібування біоплівкоутворювальних стафілококів, що може бути свідченням прояву антагоністичних властивостей лише за функціональної активності живих клітин.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання щодо вивчення видового спектру лактобацилярної мікробіоти як важливого компонента природних екосистем людського організму, поглиблено знання, що стосуються біологічної активності лактобацил у формуванні відповідних мікробіоценозів та шляхів їх стабілізації за умов дисбіотичних змін.

1. З організму практично здорових осіб за використання культурального метода лактобацили виділяються у різних відсоткових частках у залежності від природної екосистеми: найбільший відсоток з ротоглотки (81,1 %), 62,5% - з травного тракту і найменшу кількість – 45 % з вагіни. У всіх екологічних нішах встановлено домінування виду *L. acidophilus* (30,3 %).

Видовий спектр усіх біотопів включає *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum* і *L. rhamnosus*, за виключенням *L. helveticus* (6,9 %) та *L. gasseri* (4,2 %), які представлені у вагінальному тракті. У всіх екосистемах переважали гетероферментативні лактобацили.

Зафіксовано дисоціацію у культурах лактобацил штаму *L. rhamnosus*, ізольованих від осіб з дисбіотичними порушеннями, за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями.

2. Пробиотичні штами *L. plantarum* P17630, *L. acidophilus* KS 400, *L. plantarum* 8R-A3 спричиняють виражене пригнічення росту умовно-патогенних бактерій. *L. plantarum* 8R-A3 проявив найвищу активність відносно клінічних ізолятів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Найвищу протигрибкову дію встановлено для *L. plantarum* P17630.

Ізоляти лактобацили від практично здорових жінок, проявляють більш виражену протигрибкову дію, ніж ізоляти від жінок з проявами вульвовагінального кандидозу. Відносно видів *C. non-albicans* антагонізму не виявлено.

3. Найвищі показники адгезивності до клітин букального епітелію встановлено для *L. acidophilus* ротоглотки ( $4,12 \pm 0,07$ ) *L. plantarum* вагіни ( $4,36 \pm 0,22$ ); для ізолятів травного тракту - для виду *L. casei* ( $4,66 \pm 0,04$ ). Середні значення адгезивності пробиотичних лактобацил були дещо вищими і для різних видів визначалися у межах  $4,4 \pm 0,18$  -  $5,18 \pm 0,03$ .

4. Встановлено відмінності в антибіотикочутливості ізолятів лактобацил, виділених з ротоглотки, та кишкових штамів, значною мірою чутливими до аміноглікозидів та тетрацикліну, які, зазвичай, є активними відносно представників ентеробактерій, що може бути непрямим свідченням міжвидового обміну генетичним матеріалом серед представників однієї екологічної ніші.

5. Пробиотичний штам *L. plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro* має здатність утворювати біоплівкову форму.

У змішаній культурі молочнокислі бактерії індукують загибель стафілококів, виділених із гною пустул хворих на *acne vulgaris*, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну. Визначальним фактором у клінічному перебігу вугрової хвороби є саме здатність бактерій до плівкоутворення, що підтверджено виявленням генів *icaA* та *icaD*.

6. Пробиотичний штам лактобацил (*L. plantarum* 8R-A3) виявляє більш виражений антагоністичний ефект на культури стафілокока в порівнянні з активністю клінічних ізолятів при збереженні мінімальної життєздатності біоплівкової форми стафілокока та індукує значні ультраструктурні зміни у клітинах стафілококів.

У змішаних культурах біоплівкових стафілококів з індигенними штамми лактобацил встановлено зростання кількості інволюційних і лізованих клітин, а також їх перехід у стан спокою, що зафіксовано ТЕМ.

7. При вивченні метаболічних факторів антагоністичної активності лактобацил встановлено індукцію інгібуючої дії нативних культур лактобацил на початку стаціонарної фази їхнього росту. Причому пригнічуюча антимікробна активність супернатанту лактобацил за умов нейтралізації дії гідрогена діоксиду і лактату не виявляється за відсутності живих клітин лактобацил та індуктивного впливу біоплівкових штамів стафілококів *S. aureus*. Серед індигенних лактобацил саме представники виду *L. plantarum* виявляють найвищу активність.

8. За умов антибіотикоасоційованого дисбактеріозу відновлення вихідних кількісних рівнів лактобацил та біфідобактерій було досягнуто лише у відновний період серед мишей, яким не згодували біопрепарати (спонтанне відновлення) та за умов використання аутоштамів лактобацил. Процес відновлення нормобіоценозу серед тварин обох груп практично не відрізнявся.

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для лікування та профілактики інфекційних запальних процесів різної локалізації рекомендується включати пробиотичні препарати лактобацил (лактобактерин, гінофлор, гінолакт) у відповідності до їхнього видового складу, призначення та протимікробної активності.

Так, для лікування гнійно-запальних процесів, які спричиняються *S. aureus* та *P. aeruginosa* можуть бути рекомендовані препарати, які містять *L. plantarum* 8R-A3. Високо ефективною при лікуванні ешерихіозів та патогенних процесів є *L. plantarum* 8R-A3. Для лікування вульвовагінальних кандидозів, спричинених *C. albicans* та *C. non-albicans* рекомендовано препарати, які містять *L. plantarum* P17630.

У патогенезі *acne vulgaris* слід враховувати дисбіотичні порушення у інших екосистемах організму людини. З метою підвищення ефекту лікування *acne vulgaris* доцільно застосовувати як комбінування протимікробних хіміотерапевтичних препаратів з біопрепаратами лактобацил, так і комплексне лікування – внутрішнє застосування еубіотиків із засобами місцевої біотерапії.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Лаврик Г. С.** Характеристика чутливості до антибактерійних препаратів лактобактерій, ізольованих з різних екологічних ніш / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, Л. М. Бурова // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. -2009. - № 4. - С. 68-73. *(Особистий внесок дисертанта: виділення та ідентифікація бактерій роду Lactobacillus, чутливість до протимікробних препаратів, статистична обробка матеріалу, підготовка статті до друку).*
2. **Лаврик Г. С.** Видовий спектр і антибіотикочутливість лактобактерій та грибів роду *Candida*, виділених з вагіни практично здорових жінок / І. В. Тимчук, Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, О. В. Кулик // Biomed. Biosoc. Anthropol. - 2012. - № 18. - С. 91-95. *(Особистий внесок дисертанта: виділення та ідентифікація лактобацил, визначення чутливості до протимікробних препаратів, статистична обробка матеріалу, підготовка статті до друку).*
3. **Лаврик Г. С.** Антагоністичні властивості лактобактерій, виділених з вагіни, відносно умовно-патогенної мікрофлори / Г. С. Лаврик, І. В. Тимчук, О. П. Корнійчук, Л. П. Костюк // Biomed. Biosoc. Anthropol. - 2014. - № 22. - С. 99-103. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, аналіз літератури та результатів, підготовка статті до друку).*
4. **Лаврик Г. С.** Характеристика адгезивних властивостей лактобацил - клінічних ізолятів та складників біопрепаратів / Г. С. Лаврик // Анналі Мечниковського інституту. - 2015. - № 2. - С. 200-203. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).*
5. **Лаврик Г. С., Корнійчук О. П.** Чувствительность к химиотерапевтическим противомикробным препаратам планктонных и биопленочных форм стафилококков. *Современные тенденции развития науки и технологий : сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно- практической конференции, 30 ноября 2015 г. Белгород, 2015. С. 99-105. (Особистий внесок дисертанта: ідентифікація мікроорганізмів, встановлення чутливості до антимікробних препаратів, підготовка статті до друку).*
6. **Лаврик Г. С.** Біоплівкова форма стафілококів у моно- та бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук // Біологічні Студії/Studia Biologica. - 2015. - № 3. - С. 89-98. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, опрацювання літератури, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).*
7. **Лаврик Г. С.** Біосумісність індигенних та пробіотичних штамів лактобактерій в експерименті / Г. С. Лаврик // Світ медицини та біології. - 2016. - № 2. - С. 124-128. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальної частини по створенню антибіотикоасоційованого дисбактеріозу, аналіз літератури, облік результатів, підготовка статті до друку).*
8. **Лаврик Г. С.** Альтерація морфологічної структури стафілококів за культивування у змішаній культурі з лактобацилами (за даними електронно-мікроскопічного дослідження) / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, Л. М. Бурова // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2016. - № 4. - С. 28-32. *(Особистий внесок дисертанта: забір матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів,*



*експериментальні дослідження, статистична обробка матеріалу, огляд літератури, підготовка статті до друку).*

9. **Lavryk G.** Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli / G. Lavryk, O. Korniyuchuk, M. Tymkiv / *Regulatory Mechanisms Biosystems*. - 2017. - Vol. 8, № 1. - P. 98-103. *(Особистий внесок дисертанта: забір матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, експериментальні дослідження, статистична обробка матеріалу, огляд літератури, підготовлено статтю до друку).*

10. **Лаврик Г. С.** Антимікробна активність лактобацил відносно стафілококів, виділених з біоплівки хворих *asne vulgaris* / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук // *Мікробіологія і біотехнологія*. - 2020. - № 1. - С. 69-79. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, огляд літератури, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).*

11. Патент на корисну модель 100849 Україна, МПК С 12 N 1/20. Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / **Лаврик Г. С.**, Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. - № u 2015 02085; заявл. 10.03.15; опубл. 10.08.2015, Бюл. №15. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, оформлення реферату та формули винаходу).*

12. Патент на корисну модель 100850 Україна, МПК С 12 N 1/04. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / **Лаврик Г. С.**, Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. - № u 2015 02087; заявл. 10.03.15; опубл. 10.08.2015, Бюл. № 15. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, оформлення реферату та формули винаходу).*

13. **Лаврик Г. С.** Видовий спектр та чутливість до антимікробних препаратів лактобацил, виділених з вагіни практично здорових жінок / Г. С. Лаврик, І. В. Тимчук, О. П. Корнійчук // XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського: тези доповідей, 1-6 жовтня 2013 р. – Ялта, 2013. - С. 277. *(Особистий внесок дисертанта: виділення та ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus*, чутливість до протимікробних препаратів, статистична обробка матеріалу, підготовка тез до друку).*

14. **Лаврик Г. С.** Адгезивні властивості лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук // Довкілля і здоров'я: збірник матеріалів науково-практичної конференції, 23 квітня 2015 р. – Тернопіль, 2015. - С. 122-123. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, підготовка тез до друку).*

15. **Лаврик Г. С.** Адгезивні властивості лактобацил / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, Л. М. Бутова, І. В. Тимчук // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу: збірник наукових праць щорічної науково-практичної конференції з міжнародною участю, 21-22 травня 2015р. - Львів, 2015. - С. 124-126. *(Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, підготовка тез до друку).*

16. **Лаврик Г. С.** Деструктуючий вплив лактобактерій на біоплівкову форму стафілококів / Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук // Досягнення та перспективи розвитку

мікробіології: програма та тези доповідей міжнародної наукової конференції, 12-14 жовтня 2016 р. - Львів, 2016. - С. 85-87. (Особистий внесок дисертанта: планування і виконання експерименту, підготовка тез до друку).

### АНОТАЦІЯ

**Лаврик Г. С. Характеристика біологічних властивостей лактобацил за взаємодії з автохтонною і патогенною мікробіотою *in vivo* та *in vitro*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія - Одеський національний університет імені І. І. Мечникова МОН України, Одеса, 2020.

Дисертація присвячена мікробіологічному дослідженню біологічних властивостей індигенних лактобацил і встановлення характеру їхньої взаємодії із пробіотичними штамми та іншими мікроорганізмами. На підставі проведених досліджень доповнено новими даними уявлення щодо видового спектра бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з різних екосистем людського організму, їхньої біологічної активності та антибіотикочутливості.

За умов антибіотикоасоційованого дисбактеріозу *in vivo* доведено більш високу ефективність застосування біокорегуючих препаратів для відновлення лактобацилярної мікробіоти в порівнянні з використанням аутоштамів лактобацил.

При вивченні процесу біоплівкоутворення вперше досліджено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 (48-годинної монокультури) в умовах *in vitro* формувати біоплівку та індукувати загибель біоплівкоутворювальних стафілоків у змішаних культурах, виділених із гною пустул хворих на *acne vulgaris*. Доведено незворотні ультраструктурні зміни біоплівкоутворювальних стафілококів під впливом пробіотичних штамів лактобацил. Показано, що у змішаній культурі молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель стафілококів, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну. Встановлено, що антагоністична активність лактобацил індукується біоплівкоутворювальними стафілококами лише за функціональної активності живих клітин лактобацил.

**Ключові слова:** *Lactobacillus spp.*, біологічні властивості, пробіотичні штами, антагоністична активність, біоплівкоутворювальні стафілококи, *acne vulgaris*

### АННОТАЦИЯ

**Лаврик Г. С. Характеристика биологических свойств лактобацилл при взаимодействии с автохтонной и патогенной микробиотой *in vivo* и *in vitro*. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.07 - микробиология - Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова МОН Украины, Одесса, 2020.

Диссертация посвящена микробиологическому изучению биологических свойств индигенных лактобацилл и установления характера их взаимодействия с пробиотическими штаммами и другими микроорганизмами. На основании проведенных исследований дополнено новыми данными представления о видовом спектре бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных из различных экосистем

человеческого организма, их биологической активности и антибиотикочувствительности.

В условиях антибиотико-ассоциированного дисбактериоза *in vivo* доказано более высокую эффективность применения биопрепаратов для восстановления лактобациллярной микробиоты по сравнению с использованием аутоштаммов лактобацилл.

При изучении процесса микробных биоплёнок впервые исследованы способность пробиотического штамма *L. plantarum* 8R-A3 в условиях *in vitro* формировать биопленку и индуцировать гибель пленкообразующих стафилококков в смешанных культурах, выделенных из гнойных пустул больных *acne vulgaris*. Доказано развитие необратимых ультраструктурных изменений пленкообразующих стафилококков под влиянием пробиотических штаммов лактобацилл. Показано, что в смешанной культуре молочнокислые бактерии способны индуцировать гибель стафилококков, находящихся в биоплёночной форме, не переводя ее в планктонную. Установлено, что антагонистическая активность лактобацилл индуцируется пленкообразующими стафилококками только благодаря функциональной активности живых клеток лактобацилл.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus spp.*, биологические свойства, пробиотические штаммы, антагонистическая активность, пленкообразующие стафилококки, *acne vulgaris*

## SUMMARY

**Lavryk G.S. Characteristics of biological properties of lactobacilli based on *in vivo* and *in vitro* interaction with autochthonous and pathogenic microbiota. - Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.**

Thesis for the Candidate of Biological Sciences degree (doctor of philosophy) according to a specialty 03.00.07 - Microbiology - Odessa I.I. Mechnikov National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2020.

The dissertation is devoted to the results of a comparative study of the biological properties of indigenous lactobacilli and the assessment of the nature of their interaction with probiotic strains and other microorganisms.

It was found that lactobacilli can be isolated in different percentages depending on the natural ecosystem - the largest percentage was isolated from the oropharynx (81.1%), and the smallest number (45%) from the vagina. Dominance in all ecological niches of *L. acidophilus* species was established (30.3%). Heteroenzymatic lactobacilli predominated in all ecosystems. The dissociation of *L. rhamnosus* strain by morphological, cultural, and biochemical properties under conditions of dysbiotic changes was recorded.

The probiotic strain *L. plantarum* 8R-A3 showed the highest antagonistic activity against gram-negative bacteria, and *L. plantarum* P17630 - against fungi of the genus *Candida*.

The correlation between antimicrobial susceptibility of lactobacilli isolates and the microbiota according to the niches they inhabit has been established. Oropharyngeal isolates of lactobacilli are characterized by sensitivity to antimicrobial drugs, which is typical for the gram-positive microflora inhabiting the pharynx, and some intestinal isolates are characterized by sensitivity similar to that of enterobacteria.

Under conditions of antibiotic-associated dysbacteriosis *in vivo*, higher efficiency of the use of biocorrective drugs to restore the lactobacilli microbiota in comparison with the use of autochthonous lactobacilli strains has been proven, but the baseline values of *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* were not achieved. In the control group of animals that were not fed with biologicals and in the group of mice under conditions of use of autochthonous strains, the restoration of the number of lactobacilli and bifidobacteria occurred only in the recovery period.

The ability of the probiotic strain *L. plantarum* 8R-A3 (48-hour monoculture) to form a biofilm *in vitro* was observed for the first time when studying the process of biofilm formation. In mixed culture, lactic acid bacteria are able to induce the death of biofilm-forming staphylococci, as shown in the biofilm modeling using staphylococci isolated from the pus of pustules in patients with *acne vulgaris*.

Irreversible ultrastructural changes in biofilm-forming staphylococci under the influence of probiotic strains of lactobacilli were proven, while in mixed cultures with indigenous isolates of lactobacilli, staphylococci acquired the ability to transfer into an inactive state. It has been proven for the first time that in a mixed culture, lactic acid bacteria are able to induce the death of staphylococci in biofilm form without converting it to planktonic, and also it was observed growth of lactobacilli (probiotic and indigenous isolates) on glucose agar (1%) under aerobic conditions after their isolation from mixed cultures with biofilm-forming staphylococci.

Among the 27 isolates of *S. aureus* received from the pus of pustules in patients with *acne vulgaris* there was detected the presence of *icaA* genes in 35.71% of strains, and the *icaD* gene in 53.57%. The determining factor in the clinical course of acne is the ability of bacteria to form biofilms.

In the study of metabolic factors of antagonistic activity of lactobacilli, the induction of inhibitory action of lactobacilli native cultures at the beginning of the stationary phase of their growth was established. Filtration of the lactobacilli supernatant led to a sharp decrease in their activity, and when neutralizing this fluid with 2n NaOH and catalase, no inhibition of biofilm-forming staphylococci was recorded, which may indicate that the antagonistic properties appear only in case of functional activity of living cells.

**Key words:** *Lactobacillus spp.*, biological properties, probiotics, antagonism, biofilm-forming staphylococci, *acne vulgaris*.