

О. Ю. Ісаєнко<sup>1</sup>, О. В. Книш<sup>1</sup>, Є. М. Бабич<sup>1</sup>, С. В. Зачепило<sup>2</sup>,  
О. М. Савінова<sup>1</sup>, О. А. Набойченко<sup>1</sup>

## Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова  
Національної академії медичних наук України», м. Харків

<sup>2</sup>Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна  
академія», м. Полтава

**Ключові слова:** продукти метаболізму,  
*Saccharomyces boulardii*, протимікробна  
активність, стафілококи, коринебактерії

Дослідження останніх років доводять, що основні ефекти пробіотичних препаратів досягаються саме завдяки продуктам життєдіяльності мікроорганізмів – екзометаболітам. Метаболітні пробіотики розглядають як окремий клас пробіотичних препаратів з ефективністю, збіставною з дією пробіотиків, до складу яких входять продуценти [1, 2]. Беручи до уваги ряд недоліків клітинної пробіотикотерапії та обнадійливі результати застосування деяких зарубіжних метаболітних пробіотиків [1, 3, 4], видаються перспективними подальші дослідження, спрямовані на розробку нових вітчизняних засобів боротьби з дисбіозами та інфекційними захворюваннями на основі екзометаболітів пробіотиків.

Сахароміцети не є класичними пробіотиками, так як не відносяться до представників нормальної мікрофлори здорової людини та не колонізують кишечник. Але здатність позитивно впливати на ріст ендогенної кишкової флори та функції шлунково-кишкового тракту стали підставою для віднесення цих мікроорганізмів до пробіотиків. Гриби сахароміцети мають пряму антагоністичну дію відносно багатьох видів патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здатних викликати кишкові інфекції. Вони також мають безумовну перевагу перед бактеріальними пробіотиками – характеризуються природною стійкістю до антибіотиків і не здатні передавати генетичні фактори резистентності бактеріям. На

особливу увагу заслуговують дані щодо ефективності застосування сахароміцетів при лікуванні антибіотик-асоційованих та вірусних діарей. Крім того, доведено їхню антитоксичну дію відносно ентеротоксинів та цитотоксинів [5–7]. Відсутність інформації про антагоністичні властивості сахароміцетів і продуктів їхнього метаболізму щодо патогенних коринебактерій й умовно-патогенних представників мікрофлори верхніх дихальних шляхів свідчить про доцільність проведення досліджень у цьому напрямі з одночасним визначенням оптимальних способів і умов одержання продуктів метаболізму з високою пробіотичною активністю.

**Мета дослідження** – оцінити перспективність застосування продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* для розробки протистафілококових і протидифтерійних засобів.

**Матеріали та методи.** Як продуценти метаболітів були використані гриби *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARDI®, Schonen, Швейцарія. У роботі досліджені тест-штами культур: циркулюючий штам *Staphylococcus epidermidis* № 558, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium xerosis* № 41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 11.

**Отримання метаболітів.** З добової культури сахароміцетів готували суспензії клітин різної оптичної густини: 1; 5; 10; 15 одиниць за шкалою Мак-Фарланда та здійснювали інокуляцію в 1 % цукровий бульйон у співвідношенні 1:9, досягаючи різної вихідної концентрації клітин. Отримані суспензії інкубували протягом 24, 48 та 72 год за

температури 37 °С, вимірюючи оптичну густину бульйонних культур через кожні 24 год. Після інкубації бульйонні культури центрифугували при 3000 об/хв впродовж 60 хв. Надосадову культуральну рідину фільтрували, використовуючи стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм (Владіпор, Росія).

Дослідження протимікробної активності метаболітів у рідкому середовищі проводили наступним чином: у ряд пробірок вносили фільтрати, отримані після 24-, 48-, 72-год культивування сахароміцетів різних вихідних концентрацій (А, В, С, D), та фільтрат культуральної рідини з найнижчою вихідною концентрацією посівного матеріалу, розведений цукровим бульйоном: А1 (1:19); А2 (1:9); А3 (1:1). Додавали бактеріальну суспензію тест-штамів з оптичною густиною 1,0 за шкалою МакФарланда. Співвідношення об'ємів культуральної рідини та суспензії тест-штаму складало 9:1. Контрольні проби містили 1 % цукровий бульйон і відповідну тест-культуру. Дослідні та контрольні проби витримували при температурі 37 °С протягом 2, 24, 48 год. З метою визначення характеру антимікробної дії метаболітів – бактеріостатичної чи бактеріцидної, з проб, в яких після експозиції були відсутні візуальні ознаки росту тест-штаму в рідкому середовищі (прозоре середовище), здійснювали висів на відповідне тверде поживне середовище – кров'яний або жовтково-сольовий агар.

Усі досліди проводили в чотирьох повторях. Визначали середні значення отриманих показників (М) та їхні стандартні відхилення ( $\pm m$ ). Достовірність

різниці між отриманими показниками визначали за допомогою критерію Стюдента. Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали з використанням програмного пакета Microsoft Excel 2010.

**Результати та їх обговорення.** Приріст біомаси продуцента метаболітів спостерігали протягом усього терміну дослідження, про що свідчить постійне збільшення оптичної густини бульйонних культур сахароміцетів. Але швидкість збільшення є найвищою протягом першої доби культивування й поступово знижується впродовж наступних двох діб. Причому, чим нижчою є вихідна концентрація клітин у зразку, тим швидше збільшується його оптична густина. Через 72 год культивування показники оптичних густин усіх чотирьох зразків є близькими й відповідають концентраціям клітин у межах одного порядку (табл. 1).

Експозиція тест-штамів у фільтратах 24-год бульйонних культур сахароміцетів протягом 2 год не пригнічує ріст стафілококів та *Corynebacterium diphtheriae*, але виявляє бактерицидний ефект фільтратів С і D відносно *Corynebacterium xerosis* (табл. 2). Через 24 год експозиції пригнічується ріст обох видів стафілококів: *Staphylococcus epidermidis* – у фільтратах В, С та D та *Staphylococcus aureus* – у фільтратах С та D. Бактерицидна дія відносно коринебактерій спостерігається через 24 год експозиції в усіх фільтратах, крім розведених зразків. Через 48 год витримки виявляється бактерицидний вплив нерозведених фільтратів на коринебактерії, бактеріостатичний ефект фільтратів В,

Таблиця 1

*Показники оптичної густини бульйонних культур Saccharomyces boulardii з різною вихідною концентрацією продуцента метаболітів за різної тривалості культивування, М  $\pm$  m (n = 4)*

№ п/п	Зразок бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i>	Показник оптичної густини за шкалою МакФарланда (одиниці мутності) у різні терміни культивування			
		вихідні	через 24 год	через 48 год	через 72 год
1	А	0,52 $\pm$ 0,70	5,0 $\pm$ 0,9*	7,0 $\pm$ 0,45*	8,75 $\pm$ 0,80*
2	В	1,05 $\pm$ 0,15	6,30 $\pm$ 0,90*	8,20 $\pm$ 0,50*	8,90 $\pm$ 0,50*
3	С	1,95 $\pm$ 0,35	7,75 $\pm$ 0,80*	8,40 $\pm$ 0,75*	9,35 $\pm$ 0,85*
4	D	3,10 $\pm$ 0,65	8,40 $\pm$ 0,60*	8,85 $\pm$ 0,55*	9,90 $\pm$ 0,84*

Примітка. \*Статистично достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ) відносно вихідного значення.

**Життєздатність тест-культур стафілококів та коринебактерій за впливу фільтратів 24-год бульйонних культур грибів *Saccharomyces boulardii***

№ п/п	Тест-культура	Час експозиції, год	Фільтрат бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i>							Цукровий бульйон
			A1	A2	A3	A	B	C	D	
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	+	±	±	±	+
		48	+	+	+	+	±	±	±	+
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	+	+	±	±	+
		48	+	+	+	+	+	±	±	+
3	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2	+	+	+	+	+	–	–	+
		24	+	+	+	–	–	–	–	+
		48	+	+	+	–	–	–	–	+
4	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	–	–	–	–	+
		48	+	+	+	–	–	–	–	+

Примітка. Тут і в табл. 3–4: + наявний ріст культури в рідкому й на твердому поживних середовищах, ± бактеріостатичний ефект, – бактерицидний ефект.

C, D – на *Staphylococcus epidermidis*, C та D – на *Staphylococcus aureus*.

2-год експозиція у фільтратах 48-год бульйонних культур сахароміцетів не пригнічує ріст стафілококів та *Corynebacterium diphtheriae*, але фільтрати C та D мають бактерицидний вплив на *Corynebacterium xerosis* (табл. 3). Після 24- та 48-год експозиції спостерігається пригнічення росту *Staphylococcus epidermidis* в усіх нерозведених фільтратах, а *Staphylococcus aureus* – у фільтратах B, C та D. Усі нерозведені фільтрати 48-год бульйонних культур сахароміцетів після 24- та 48-год витримки виявляють бактерицидну, а розведений 1:1 фільтрат А – бактеріостатичну дію відносно коринебактерій.

Витримка протягом 2 год у фільтратах 72-год бульйонних культур грибів *Saccharomyces boulardii* не призводить до пригнічення росту тест-культур стафілококів та *Corynebacterium diphtheriae* (табл. 4). У той самий час фільтрати C та D проявляють бактерицидну дію на *Corynebacterium xerosis*

після 2-год витримки. 24- та 48-год експозиція має результатом бактеріостатичний ефект відносно *Staphylococcus epidermidis* нерозведених фільтратів, відносно *Staphylococcus aureus* – фільтратів B, C та D. Бактерицидний ефект нерозведених фільтратів відносно коринебактерій спостерігається після 24- та 48-год витримки. Розведений 1:1 фільтрат А пригнічує ріст коринебактерій протягом 24- та 48-год експозиції.

#### Висновки

Таким чином, нами досліджено протимікробну активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii*, накопичених у культуральній рідині в період інтенсивного приросту біомаси продуцента. Отримані дані свідчать про те, що продукти метаболізму бульйонної культури сахароміцетів мають виражені протимікробні властивості відносно коринебактерій та стафілококів. Коринебактерії виявилися більш чутливими до метаболітів *Saccharomyces boulardii*,

Таблиця 3

*Життєздатність тест-культур стафілококів та коринебактерій за впливу фільтратів 48-год бульйонних культур грибів *Saccharomyces boulardii**

№ п/п	Тест-культура	Час експозиції, год	Фільтрат бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i>							Цукровий бульйон
			A1	A2	A3	A	B	C	D	
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	±	±	±	±	+
		48	+	+	+	±	±	±	±	+
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	+	±	±	±	+
		48	+	+	+	+	±	±	±	+
3	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2	+	+	+	+	+	–	–	+
		24	+	+	±	–	–	–	–	+
		48	+	+	±	–	–	–	–	+
4	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	±	–	–	–	–	+
		48	+	+	±	–	–	–	–	+

Таблиця 4

*Життєздатність тест-культур стафілококів та коринебактерій за впливу фільтратів 72-год бульйонних культур грибів *Saccharomyces boulardii**

№ п/п	Тест-культура	Час експозиції, год	Фільтрат бульйонних культур <i>Saccharomyces boulardii</i>							Цукровий бульйон
			A1	A2	A3	A	B	C	D	
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	±	±	±	±	+
		48	+	+	+	±	±	±	±	+
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	+	+	±	±	±	+
		48	+	+	+	+	±	±	±	+
3	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2	+	+	+	+	+	–	–	+
		24	+	+	±	–	–	–	–	+
		48	+	+	±	–	–	–	–	+
4	<i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	2	+	+	+	+	+	+	+	+
		24	+	+	±	–	–	–	–	+
		48	+	+	±	–	–	–	–	+

ніж стафілококи. Результати досліджень вказують на залежність протимікробної активності фільтратів від посівної дози грибів і часу експозиції тест-штаму в зразках фільтратів, що містять метаболіти. 48-год фільтрати бульйонних культур *Saccharomyces*

*boulardii* показали більш високу протимікробну активність відносно досліджуваних тест-штамів, ніж 24-год фільтрати. У той самий час нами не виявлено різниці між протимікробною активністю 48- та 72-год бульйонних культур пробіотика.

1. Плоскирева А. А. Место метаболитных пробиотиков в практике клинициста / А. А. Плоскирева, А. В. Горелов // РМЖ. – 2014. – № 3. – С. 232–236.
2. Молохова Е. И. Разработки отечественных метаболитных пробиотиков и их стандартизация / Е. И. Молохова, Ю. В. Сорокина // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). – 2011. – Т. 26, № 1-1. – С. 29–33.
3. Несчислаев В. А. Исследование специфической активности комплексного метаболитного пробиотика / В. А. Несчислаев, Т. В. Крылова, Л. П. Чистохина // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2013. – № 2(46). – С. 32–34.
4. Пробиотики: вектор развития [Электронный ресурс] / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. В. Дармов [и др.] // Инновационный сборник научных статей «Кишечная микрофлора: взгляд изнутри». – 2013. – Режим доступа до ресурсу: <http://gastroportal.ru/files/mikroflora.pdf>.
5. Пробиотики и пребиотики [Электронный ресурс] // Всемирная Гастроэнтерологическая Организация. Практические рекомендации. – 2008. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-russian-2008.pdf>.
6. Щербенков И. М. Острая ротавирусная инфекция у детей [Электронный ресурс] / И. М. Щербенков // Участковый педиатр. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2014. – № 1. – С. 17. Режим доступу: [http://con-med.ru/magazines/pediatrist/pediatrist-01-2014/ostraya\\_rotavirussnaya\\_infektsiya\\_u\\_detey/](http://con-med.ru/magazines/pediatrist/pediatrist-01-2014/ostraya_rotavirussnaya_infektsiya_u_detey/)
7. Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea / E. C. Dinleyici [et al.] // Expert Opin Biol Ther. – 2012. – V. 12, № 4. – P. 395–410.

**О. Ю. Исаенко, О. В. Книш, Е. М. Бабич, С. В. Зачепило, О. М. Савинова, О. А. Набойченко**

### **Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів та коринебактерій**

Основні ефекти пробіотичних препаратів досягаються завдяки продуктам життєдіяльності мікроорганізмів – екзометаболітам. Розробка нових вітчизняних засобів боротьби з дисбіозами та інфекційними захворюваннями на основі екзометаболітів пробіотиків сьогодні є актуальною.

*Мета дослідження* – оцінити перспективність застосування продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* при розробці протистафілококових та протидифтерійних засобів.

У дослідженні вивчено протимікробну дію фільтратів бульйонних культур сахароміцетів на тест-культури: циркулюючий штам *Staphylococcus epidermidis* № 558, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium xerosis* № 41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 11.

Продукти метаболізму бульйонної культури сахароміцетів показали виражені протимікробні властивості відносно коринебактерій та стафілококів. Коринебактерії виявилися більш чутливими до метаболітів *Saccharomyces boulardii*, ніж стафілококи. Протимікробна активність фільтратів залежить від посівної дози грибів і часу експозиції тест-штаму в зразках фільтратів, що містять метаболіти. Важливим чинником, що впливає на вираженість протимікробної дії фільтратів, є тривалість культивування продуцента.

Отримані дані свідчать про перспективність розробки протидифтерійних та протистафілококових засобів на основі екзометаболітів пробіотичного штаму *Saccharomyces boulardii*.

*Ключові слова*: продукти метаболізму, *Saccharomyces boulardii*, протимікробна активність, стафілококи, коринебактерії

**А. Ю. Исаенко, А. В. Книш, Е. М. Бабич, С. В. Зачепило, А. М. Савинова, О. А. Набойченко**

### **Противомикробная активность продуктов метаболизма *Saccharomyces boulardii* по отношению к тест-культурам стафилококков и коринебактерий**

Основные эффекты пробиотических препаратов достигаются благодаря продуктам жизнедеятельности микроорганизмов – экзометаболитам. Разработка новых отечественных средств борьбы с дисбиозами и инфекционными заболеваниями на основе экзометаболитов пробиотиков на сегодняшний день является актуальной.

*Цель исследования* – оценить перспективность применения продуктов метаболизма *Saccharomyces boulardii* при разработке противостафилококковых и противодифтерийных средств.

В работе изучено противомикробное действие фильтратов бульонных культур сахароміцетов на тест-культуры: циркулирующий штамм *Staphylococcus epidermidis* № 558, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium xerosis* № 41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 11.

Продукты метаболизма бульонной культуры сахароміцетов показали выраженные противомикробные свойства по отношению к коринебактериям и стафилококкам. Коринебактерии оказались более чувствительными к метаболитам *Saccharomyces boulardii*, чем стафилококки. Противомикробная активность фильтратов зависит от посевной дозы грибов и времени экспозиции тест-штамма в образцах фильтратов, содержащих метаболиты. Важным фактором, влияющим на выраженность противомикробного действия фильтратов, является продолжительность культивирования продуцента.

---

Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки противодифтерийных и противостафилококковых средств на основе экзометаболитов пробиотического штамма *Saccharomyces boulardii*.

*Ключевые слова:* продукты метаболизма, *Saccharomyces boulardii*, противомикробная активность, стафилококки, коринебактерии

**O. Yu. Isayenko, O. V. Knysh, E. M. Babych, S. V. Zachepilo, O. M. Savinova,  
O. A. Naboychenko**

**Antimicrobial activity of metabolites of *Saccharomyces boulardii* against test cultures of *Staphylococci* and *Corynebacteria***

Main effects of probiotics are achieved due to the products of microorganism's vital activity – exometabolites. The development of new domestic remedies against dysbiosis and infectious diseases on the basis of exometabolites of probiotics is relevant for today.

The aim of the study is to evaluate the prospects of usage of metabolic products of *Saccharomyces boulardii* for the development of anti-staphylococcal and anti-diphtheria agents.

Antimicrobial activity of filtrates of *Saccharomycetes* broth cultures on test cultures: the circulating strain of *Staphylococcus epidermidis* № 558, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium xerosis* № 41, *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* №11 was studied.

Metabolic products of the broth culture of *Saccharomyces boulardii* showed pronounced antimicrobial properties against *Corynebacteria* and *Staphylococci*. *Corynebacteria* appeared more sensitive to *Saccharomyces boulardii* metabolites than *Staphylococci*. Antimicrobial activity of the filtrates depends on the seed dose of fungi and the exposure time of the test strain in the samples of filtrates containing metabolites. Cultivation period of the producer is important factor that influencing on the intensity of antimicrobial activity of filtrates.

The data obtained indicate the prospects of development of anti-diphtheria and anti-staphylococcal agents on the basis of the exometabolites of the *Saccharomyces boulardii* probiotic strain.

*Key words:* metabolic products, *Saccharomyces boulardii*, antimicrobial activity, *Staphylococcus*, *Corynebacteria*

---

Надійшла: 19 травня 2017 р.

**Контактна особа:** Ісаєнко О. Ю., ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», буд. 14/16, вул. Пушкінська, м. Харків, 61057. Тел.: + 38 0 57 731 31 51.