

УДК: 579.83+615.331+576.851.252+578.27

Гаморак Г.П.

**Антимікробна активність біфідумбактерину щодо патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів і дріжджеподібних грибів роду *Candida***

Кафедра мікробіології, вірусології, імунології (зав. каф. - д.мед.н. Р.В.Куцик)

ДВНЗ «Вано-Франківський національний медичний університет»

**Резюме.** У роботі наведені результати вивчення антимікробної (антагоністичної) активності біфідумбактерину стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів і дріжджеподібних грибів роду *Candida*. Біфідумбактерин проявляє високу антимікробну (антагоністичну) активність стосовно ентеропатогенних та умовно патогенних (*E. coli* Нly+, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) ентеробактерій, популяційний рівень яких у кишечнику зростає після 20-денних аплікацій на непошкоджену шкіру ітаконової кислоти у дозі 20мг/см<sup>2</sup>, що призводить до формування кишкового дисбактеріозу. Біфідумбактерин проявляє високу інгібуючу дію на ріст та розмноження золотистого стафілококу. Біфідумбактерин проявляє низьку активність стосовно дріжджеподібних грибів роду *Candida*.

Висока антибактеріальна активність біфідумбактерину стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій і стафілококів дозволяє рекомендувати цей пробіотик для деконтамінації патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів, а також для корекції порушеного мікробіоценозу кишечника, обумовленого 20-денними аплікаціями на непошкоджену шкіру білих щурів ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.

**Ключові слова:** Біфідумбактерин, ентеробактерії, стафілококи, дріжджеподібні гриби роду *Candida*.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.**

Мікроорганізми у природних умовах є складовими частинами біоценозу. Вони знаходяться у природі в асоціаціях як у практично здорових людей і тварин, так і при різних патологічних процесах. Ці асоціації складають важливу сукупність різних таксонів, між якими триває постійна боротьба за умови існування. Окремі види автохтонних облигатних бактерій головної мікробіоти біотопу, які пристосувалися до даного біотопу, проявляють виражену антагоністичну активність стосовно інших факультативних анаеробних та аеробних автохтонних та алохтонних бактерій, які випадково попадають у даний біотоп (додаткова, залишкова і випадкова мікрофлора). Із цих бактерій виготовляють бактерійні препарати – пробіотики, які використовують для деконтамінації патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів і для корекції порушеного мікробіоценозу. Ці препарати проявляють антимікробну активність та підсилюють фактори і механізми неспецифічного протиінфекційного захисту.

У попередніх роботах (Гаморак Г.П., 2011) нами показано, що ітаконова кислота, аплікована на непошкоджену шкіру білих щурів у дозі 20мг/см<sup>2</sup> протягом 20 діб, викликає глибокі порушення якісного і кількісного складу мікрофлори порожнини та слизової оболонки товстої і дистального відділу тонкої кишки. Для корекції порушеного мікробіоценозу використовуються різні за складом пробіотики, основу яких складають автохтонні облигатні анаеробні бактерії – представники головної мікробіоти. Тому перед їх використанням необхідно визначати антимікробну активність пробіотичних препаратів.

**Мета досліджу:** встановити антимікробну активність біфідумбактерину стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів, дріжджеподібних грибів роду *Candida* in vitro.

**Матеріал і методи дослідження**

У роботі використали біфідумбактерин (виробник ФДУП

«НВО Мікроген» МОЗ РФ, м. Перм). Сертифікат державної реєстрації № 136/09-300200000 від 10.06.2009.

В якості тест-мікробів взяли свіжовиділені патогенні (*E. coli* Нly -енеротоксигенний штамп) та умовно патогенні (*E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) ентеробактерії, золотистий стафілокок, дріжджеподібні гриби роду *Candida*, які у процесі формування дисбактеріозу кишечника у тварин були визначними [1].

Антимікробну активність біфідумбактерину визначали при сумісному культивуванні в еквівалентних співвідношеннях біфідобактерій і тест-штамів у високому стовпчику середовища Блаурока протягом 1-7 діб. Через певні проміжки культивування відбирали проби асоціативних культур, робили їх розведення від 10<sup>-2</sup> до 10<sup>10</sup> і висівали на середовища Ендо або Левіна, Плоскирева, МПА та середовище Сабуро, де одержували ізольовані колонії. Однотипні колонії підраховували для визначення популяційного рівня та ідентифікували за морфологічними, тинкторіальними, культуральними і біохімічними властивостями. Популяційний рівень визначали за наявністю кількості життєздатних колонієутворюючих одиниць (КУО) мікроба в 1 мл поживного середовища.

Статистичне опрацювання одержаних результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням критерія Стюдента. Взаємозв'язок між вивчаємими параметрами оцінювали за критерієм достовірності t. При цьому використали пакет програм Statgraphics.

**Результати дослідження та їх обговорення**

Дослідження проводились паралельно з контрольними пробами росту і розмноження ентеробактерій, стафілокока і дріжджеподібних грибів роду *Candida*, які одержували у відповідні періоди на середовищі Блаурока при глибинному вирощуванні без пробіотику та азиду натрію. Дані дослідженнями були контрольними. Паралельно одночасно культивували тест-штами у середовищі Блаурока у присутності біфідобактерій (>10<sup>7</sup> КУО/мг), що входять до складу пробіотика біфідумбактерину. Всі експериментальні дослідження супроводжувалися контролем і вони повторювалися тричі. Із одержаних результатів визначали середню арифметичну (M) та її похибку (±m) як у дослідному визначенні, так і в контролі, за яким здійснювали порівняння антимікробної активності біфідумбактерину. Результати вивчення впливу біфідумбактерину на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій наведені у таблиці 1.

Культури ентеробактерій (*E. coli*, *E. coli* Нly+, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) у середовищі Блаурока прогресивно збільшують популяційний рівень через 24, 48, 72 години культивування при оптимальних умовах (температура 37°C), а починаючи з періоду 96 годин ріст і розмноження ентеробактерій значно уповільнюється (*E. coli*), а в інших ентеробактерій популяційний рівень суттєво (P<0,005-0,001) знижується. Пониження спостерігається і через 7 діб спостереження. Таким чином, культури патогенних (енеротоксичних ешерихій) та умовно патогенних (*E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) ентеробактерій у середовищі Блаурока ростуть та інтенсивно розмножуються протягом 72 годин, а починаючи з 96 годин до 7 діб їх ріст значно уповільнюється і концентрація їх зменшується, порівняно з попередніми значеннями.

Ці ж культури у середовищі Блаурока (елективне сере-

Таблиця 1. Антимікробна активність біфідумбактерину стосовно ентеробактерій *in vitro*

Термін дослідження	E.coli			E.coli Hlg+			E.tarda			K.pneumonia		
	К	Д	Р	К	Д	Р	К	Д	Р	К	Д	Р
Вихідні показники популяційного рівня	7,03± 0,02	7,08± 0,02	>0,05	7,02± 0,04	7,09± 0,02	>0,05	7,03± 0,02	7,03± 0,02	<0,05	6,99± 0,03	6,99± 0,03	>0,05
Через 24 години культивування	10,19± 0,05	5,03± 0,003	<0,001	9,92± 0,06	6,61± 0,02	<0,001	10,83± 0,07	5,60± 0,03	<0,001	10,93± 0,06	5,85± 0,04	<0,001
P <sub>1</sub>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	
Через 48 годин культивування	11,20± 0,08	4,92± 0,05	<0,001	10,73± 0,02	5,19± 0,09	<0,001	11,34± 0,04	5,09± 0,07	<0,001	11,55± 0,03	5,03± 0,04	<0,001
P <sub>2</sub>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	
Через 72 год культивування	11,39± 0,07	4,98± 0,10	<0,001	11,36± 0,03	4,79± 0,04	<0,001	11,31± 0,03	4,76± 0,05	<0,001	11,33± 0,03	4,62± 0,03	<0,001
P <sub>3</sub>	>0,05	>0,05		<0,01	<0,05		>0,05	>0,05		<0,01	<0,01	
Через 96 годин культивування	11,14± 0,03	4,17± 0,04	<0,001	11,16± 0,04	4,23± 0,01	<0,001	10,99± 0,02	4,08± 0,03	<0,001	10,78± 0,03	3,83± 0,07	<0,001
P <sub>4</sub>	<0,05	<0,01		<0,05	<0,05		<0,01	<0,001		<0,001	<0,01	
Через 7 діб культивування	10,04± 0,07	3,60± 0,06	<0,001	9,76± 0,09	3,76± 0,05	<0,001	10,36± 0,05	4,14± 0,03	<0,001	10,31± 0,03	3,98± 0,04	<0,001
P <sub>5</sub>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,01		<0,001	<0,05		<0,001	<0,05	

Примітка: К – популяційний рівень культури через відповідний період культивування; Д – популяційні культури на середовищі, яке містить еквівалентну кількість біфідумбактерину; Р – порівняння з контрольними показниками; P<sub>1-5</sub> – порівняння з попередніми показниками

довище для біфідобактерій) у присутності еквівалентної концентрації життєздатних біфідобактерій зазнають інгібуєчої дії зі сторони останніх. Так, через 24 год культивування суттєво знижується популяційний рівень ентеротоксигенних ешерихій на 50,1% (на 3 порядки), E.coli – у 2 рази, E. tarda – на 93,42% K.pneumoniae – на 86,8% у порівнянні з популяційним рівнем, який досягають ці бактерії у середовищі без біфідумбактерину. Популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій при подальшому сумісному культивуванні продовжує поступово зменшуватися до 7 діб. З кожним днем культивування популяційний рівень E. coli зменшується, через 24 години на 40,8%, через 48 год – на 43,9%, через 72 години – на 42,2%, через 96 годин – на 69,8% та через 7 днів – на 96,7% порівняно з вихідним рівнем. Дещо інші зміни популяційного рівня встановлені у патогенних (ентеротоксигенних) ентеробактерій: через 24 години популяційний рівень E.coli Hlg+ під впливом біфідумбактерину зменшується на 7,3%, а через 48 год – на 36,6%, через 72 год – на 48,0%, через 96 год – на 67,6% та через 7 діб – на 88,6%.

Популяційний рівень інших умовно патогенних (E.tarda, K.pneumoniae) ентеробактерій під впливом біфідумбактерину зменшувався через 24 години на 25,5% і 19,5%, відповідно, через 48 годин – на 38,1% і 39,0%; через 72 год – на 47,7% і 51,3% відповідно. Культивування протягом 96 годин E. tarda і K.pneumoniae у присутності біфідумбактерину призводить до суттєвого зниження популяційного рівня на 72,3% і 82,5% відповідно, а через 7 діб – на 69,8% і 75,6% відповідно.

Таким чином, біфідумбактерин є ефективним пробіотичним препаратом, який проявляє антимікробну активність стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій (E. coli Hlg+, E. coli, E. tarda, K. pneumoniae), що беруть участь у порушенні мікробіоценозу кишкового тракту під впливом аплікації ітаконової кислоти на непошкоджену шкіру білих щурів протягом 20 днів у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.

Крім ентеробактерій, концентрація яких при використанні 20-денних аплікацій ітако-

вої кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup> суттєво зростає, збільшується при цьому популяційний рівень стафілококів і дріжджоподібних грибів роду Candida. Тому наступним етапом було виявлення антимікробної активності при сумісному культивуванні біфідумбактерину із золотистим стафілококом або дріжджоподібними грибами роду Candida. Результати вивчення антимікробної активності біфідумбактерину стосовно S. aureus і C. albicans *in vitro* наведені у таблиці 2.

Золотистий стафілокок у середовищі Блаурока через 24 години досягає популяційного рівня на 19,6% більше вихідного, а через 48 год – на 37,7%, через 72 год – на 50,4%. У подальші періоди його популяційний рівень залишається на майже однаковому рівні. Таким чином, інтенсивність розвитку чистої культури S. aureus досягає максимуму у середовищі Блаурока протягом перших трьох днів, у подальшому його популяційний рівень знаходиться на постійному (10,20±0,02 і 10,29±0,02 lg КУО/мл) високому

Таблиця 2. Антимікробна активність біфідумбактерину стосовно стафілококу і дріжджоподібних грибів роду Candida *in vitro*

Термін дослідження	S. aureus			C. albicans		
	К	Д	Р	К	Д	Р
Вихідні показники популяційного рівня (в lgКУО/мл)	7,10± 0,02	7,10± 0,02	>0,05	7,05± 0,02	7,05± 0,02	>0,05
Через 24 години культивування	8,49± 0,07	6,76± 0,04	<0,001	7,66± 0,03	6,18± 0,06	<0,001
P <sub>1</sub>	<0,001	<0,01		<0,001	<0,001	
Через 48 годин культивування	9,78± 0,07	5,79± 0,05	<0,001	8,42± 0,03	6,89± 0,04	<0,001
P <sub>2</sub>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	
Через 72 години культивування	10,68± 0,05	5,84± 0,07	<0,001	9,26± 0,02	5,60± 0,04	<0,001
P <sub>3</sub>	>0,001	<0,07		<0,001	<0,001	
Через 96 годин культивування	10,20± 0,02	5,09± 0,03	<0,001	10,08± 0,05	4,98± 0,04	<0,001
P <sub>4</sub>	<0,01	<0,01		<0,001	>0,01	
Через 7 діб культивування	10,29± 0,02	4,50± 0,03	<0,001	8,83± 0,03	4,79± 0,03	<0,001
P <sub>5</sub>	<0,05	<0,01		<0,001	<0,05	

Примітка: К – контроль (популяційний рівень культури на поживному середовищі без пробіотиків); Д – популяційний рівень культури на середовищі, що містить еквівалентну кількість біфідумбактерину; P<sub>1-5</sub> – порівняння з попередніми показниками; Р – порівняння із контрольними показниками

рівні і суттєвого зростання до 7 діб не спостерігається.

Дріжджеподібні гриби роду *Candida* ростуть і розмножуються повільніше. Через 24 години їх популяційний рівень зростає лише на 8,7%, а через 48 год – на 19,4%, через 72 год – на 31,3%, через 96 год – на 43,9%, а вже через 7 діб їх популяційний рівень знижується у порівнянні з показниками через 96 год на 14,2%.

Таким чином, культури *S. aureus* і *C. albicans* у середовищі Блаурока добре ростуть та розмножуються, досягаючи через 72-96 годин максимального популяційного рівня  $10,68 \pm 0,05$  і  $10,08 \pm 0,05$  Іг КУО/мл відповідно.

Внесення у середовище Блаурока біфідумбактерину у дозі  $7,10 \pm 0,02$  і  $7,05 \pm 0,02$  Іг КУО/мл призводить до інгибування росту і розмноження як *S. aureus*, так і *C. albicans*. Так, через 24 год популяційний рівень *S. aureus* у середовищі знижується порівняно з контролем на 25,6%, через 48 год – на 68,9%, через 72 год – на 82,9%, через 96 год – у 2 рази, а через 7 діб у 2,3 рази. Наявність у середовищі Блаурока біфідумбактерину призводить до пониження популяційного рівня *C. albicans* через 24 години лише на 14,1%, через 48 год – на 2,3%, через 72 год – на 25,9%, через 96 год – на 41,6%, а через 7 діб – тільки на 47,2%. Перераховане вище свідчить про суттєву антибактеріальну дію біфідумбактерину стосовно стафілококу, який персистує у тварин, яким проведена 20-денна аплікація ітаконової кислоти на непошкоджену шкіру у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>. Значно менша антимікробна активність біфідумбактерину встановлена стосовно дріжджеподібних грибів роду *Candida*.

### Висновки

1. Біфідумбактерин проявляє високу антимікробну (антагоністичну) активність стосовно ентеропатогенних та умовно патогенних (*E. coli* Hly+, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) ентеробактерій, популяційний рівень яких зростає після 20-денних аплікацій на непошкоджену шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>, що призводить до формування кишкового дисбактеріозу. Біфідумбактерин проявляє високу інгібуючу дію на ріст та розмноження золотистого стафілококу. Він проявляє слабку активність стосовно дріжджеподібних грибів роду *Candida*.

2. Висока антибактеріальна активність біфідумбактерину стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій і стафілококів дозволяє рекомендувати цей пробіотик для деконтамінації патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів, а також для корекції порушеного мікробіоценозу кишечника, обумовленого 20-денними аплікаціями на непошкоджену шкіру білих щурів ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.

### Перспективи подальших досліджень

Результати проведених експериментальних досліджень *in vitro* є підставою для вивчення корегуючої дії біфідумбактерину при порушеному мікробіоценозі кишечника, обумовленому 20-денними аплікаціями на непошкоджену шкіру тварин ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.

### Література

- Широбоков В.П. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом /В.П.Широбоков, Д.С.Янковський, Г.С.Димент //– Київ:ТОВ «Червона Рута – Туре»,2009.-312с.
- Гаморак Г.П. Ефективність процесу самовідновлення мікрофлори вмісту порожнини товстої кишки білих щурів після 20-денної аплікації на непошкоджену шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.//Гаморак Г.П.// Клінічна та експериментальна патологія – 2011.- Т.Х.,№3.-С.71-75.
- Гаморак Г.П. Процес самовідновлення якісного і кіль-

кісного складу мікробіоти приепітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої кишки білих щурів після 20-денної аплікації на шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup>.//Г.П.Гаморак// Буковинський медичний вісник – 2011.-№4.-С.87-91.

4. Кудик Р.В. Вплив 20-денних аплікацій на шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup> на мікрофлору порожнини дистального відділу тонкої кишки та процес її самовідновлення через 15 днів./ Р.В.Кудик, Г.П.Гаморак// Галицький лікарський вісник – 2011.- №3.-С.44-47.

5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology./D.R.Boone., R.W.Gastendhz., M.George [et al] New York: Springer – Verlag; 2001. – P.56-59.

6. Dobler G.Recent taxonomic changes and update of nomenclature for bacteria identified in clinical material./G. Dobler,I.Braveny/ /Eur j Clin Microbiol infect Dis.-2003.Vol.22.-P.643-646.

*Гаморак Г.П.*

**Антимікробна активність біфідумбактерина по отношению к патогенним и условнопатогенным энтеробактериям, стафилококкам и дрожжеподобным грибам рода *Candida***

**Резюме.** В работе приведены результаты изучения антимикробной (антагонистической) активности бифидумбактерина по отношению к патогенным и условно патогенным энтеробактериям, стафилококкам и дрожжеподобным грибам рода *Candida*. Бифидумбактерин проявляет высокую антимикробную (антагонистическую) активность по отношению к энтеропатогенным и условно патогенным (*E. coli* Hly +, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) энтеробактериям, популяционный уровень которых в кишечнике возрастает после 20-дневных аппликаций на неповрежденную кожу итаконовой кислоты в дозе 20 мг/см<sup>2</sup>, что приводит к формированию кишечного дисбактериоза. Бифидумбактерин проявляет высокое ингибирующее действие на рост и размножение золотистого стафилококка. Бифидумбактерин проявляет слабую активность по отношению к дрожжеподобным грибам рода *Candida*. Высокая антибактериальная активность бифидумбактерина к патогенным и условно патогенным энтеробактериям и стафилококкам позволяет рекомендовать этот пробиотик для деконтаминации патогенных и условно патогенных энтеробактерий, стафилококков, а также для коррекции нарушения микробиоценоза кишечника, обусловленного 20-дневными аппликациями на неповрежденную кожу белых крыс итаконовой кислоты в дозе 20 мг / см<sup>2</sup>.

**Ключевые слова:** бифидумбактерин, энтеробактерии, стафилококки, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

*Gamorak G.P.*

**Antimicrobial Activity of Bifidumbacterin on Pathogenic and Conditionally Pathogenic Enterobacteria, Staphylococcus and Yeast Fungi of the Genus *Candida***

**Summary.** We presents results of studying antimicrobial (antagonistic) activity Bifidumbacterin on pathogenic and conditionally pathogenic enterobacteria, staphylococci and fungi of the genus *Candida*. Bifidumbacterin shows high antimicrobial (antagonistic) activity against enteropathogenic and conditionally pathogenic (*E. coli* Hly +, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) Enterobacteriaceae, population levels are in the gut increases after 20-day application to intact skin itakonic acid dose 20mh/sm<sup>2</sup>, which leads to the formation of intestinal dysbiosis. Bifidumbacterin shows a high inhibitory effect on growth and reproduction of *Staphylococcus aureus*. Bifidumbacterin shows weak activity against fungi of the genus *Candida*. High antibacterial activity Bifidumbacterin on pathogenic and conditionally pathogenic enterobacteria and staphylococci can recommend this probiotic for decontamination of pathogenic and conditionally pathogenic enterobacteria, staphylococci, and to correct violations microflora intestine caused by 20-day application to intact skin of white rats itakonic acid in a dose of 20 mg / cm<sup>2</sup>.

**Key words:** Bifidumbacterin, enterobacteria, staphylococci, fungi genus *Candida*.

Надійшла 13.02.2012 року.