



Изучение свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью

В.А. Несчисляев, Е.Г. Шилова✉, А.М. Николаева, Е.В. Орлова

Пермское научно-производственное объединение «Биомед», филиал Акционерного общества
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам
«Микроген», ул. Братская, д. 177, Пермь, 614089, Российская Федерация

✉ Шилова Екатерина Геннадьевна; eket1981@mail.ru

Резюме

Актуальность. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов приобрела глобальное общемировое значение, что определяет необходимость поиска альтернативных антибактериальных средств для лечения инфекционных заболеваний, включая более широкое использование биотехнологических препаратов на основе бактериофагов и пробиотиков, в том числе метаболитного типа. Совокупность бактериотропных (антимикробных и пробиотических) свойств композиций на основе бактериофагов и метаболитов пробиотических бактерий позволяет предполагать наличие качественно нового, сочтанного антибактериального действия, а также эффективность подобных биопрепаратов в отношении антибиотикорезистентных форм микроорганизмов.

Цель. Исследование свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью.

Материалы и методы. Разработанный комплексный биопрепарат включает в себя пробиотик на основе экзометаболитов лактобактерий и комплексный бактериофаг. Оценку антимикробной активности комплексного биопрепарата проводили при помощи метода Апфельмана, диско-диффузионного метода в отношении газонных культур — го-мологических комплексному бактериофагу (*Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) и негомолгичных (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*), а также в тесте ингибирования биолюминесценции генномодифицированного индикаторного штамма *Escherichia coli* lum+. Использовали штаммы бактерий, полученные за 2019–2022 гг. из бактериологических лабораторий лечебных учреждений Пермского края (микроорганизмы выделены из различного клинического материала и биотопов). Пробиотическую активность оценивали по стимулирующему действию на модельные микроорганизмы нормофлоры.

Результаты. Комплексный биопрепарат продемонстрировал высокую специфическую антимикробную активность (показатель титра по Апфельману — $10^{-6,6 \pm 0,01}$), которая была сопоставима с показателем бактериофага ($10^{-6,9 \pm 0,01}$), входящего в состав биопрепарата. Исследование диско-диффузионным методом показало, что комплексный биопрепарат обладает более выраженным, чем отдельные его компоненты, антибактериальным действием на все тест-штаммы. Показатель оптической плотности тестовых культур отличался от контрольных значений: для *Lactobacillus plantarum* 8P-A — превышал в 2 раза, для *Bifidobacterium bifidum* 1 — в 1,5 раза, что подтверждает предположение о стимулирующем эффекте комплексного биопрепарата в отношении микроорганизмов нормофлоры. Полученные результаты свидетельствуют о совместимости фагового и пробиотического компонентов комплексного биопрепарата, а также о высоком уровне его антимикробной активности.

Выводы. Разработанный комплексный биопрепарат обладает высокой антимикробной активностью (специфической и неспецифической), проявляющейся в подавлении роста

бактериальных клеток патогенных культур, не ингибируя при этом нормальную микрофлору. Новый комплексный биопрепарат позволит расширить ассортимент препаратов с пробиотическим и антибактериальным действием, в том числе в отношении антибиотикорезистентных форм микроорганизмов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; пробиотики метаболитного типа; бактериофаги и пробиотики; бактериотропные свойства; антибактериальное и пробиотическое действие; коррекция дисбиоза; новый комплексный биопрепарат

Для цитирования: Несчислаев В.А., Шилова Е.Г., Николаева А.М., Орлова Е.В. Изучение свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):422–430. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-422-430>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Study of a combined biological product with antibacterial and probiotic activity

Valery A. Neschislyaev, Ekaterina G. Shilova✉, Alevtina M. Nikolaeva, Ekaterina V. Orlova

Perm Scientific and Production Association “Biomed”, Branch of the Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 177 Bratskaya St., Perm 614089, Russian Federation

✉ Ekaterina G. Shilova; eket1981@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. The issue of antimicrobial resistance has acquired global significance, urging the search for and use of alternative antibacterial agents to treat infectious diseases. In particular, this situation prompts wider use of biotechnology-derived medicinal products based on bacteriophages and probiotics, including those of the metabolite type. The bacteriotropic (antimicrobial and probiotic) properties of pharmaceutical compositions based on bacteriophages and metabolites of probiotic bacteria suggest a qualitatively new combined antibacterial effect, as well as effectiveness against microorganisms resistant to antibiotics.

Aim. The authors aimed to study the properties of a combined biological product with antibacterial and probiotic effects.

Materials and methods. The study focused on a combined biological product consisting of a probiotic agent based on *Lactobacillus* exometabolites and a complex bacteriophage. The antimicrobial activity evaluation involved the Appelmans method, a disc diffusion method using lawn cultures homologous (*Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., and *Shigella* spp.) and non-homologous (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Yersinia enterocolitica*) to the complex bacteriophage, and a bioluminescence inhibition test using the genetically modified indicator strain *E. coli* lum+. The study used bacterial strains isolated from various clinical samples and biotopes in bacteriological laboratories of healthcare institutions in the Perm Territory in 2019–2022. The probiotic activity was assessed by the stimulating effect on model microorganisms of the normal flora.

Results. The Appelmans method showed that the combined biological product had high antimicrobial activity against microorganisms homologous to the complex bacteriophage. The titres calculated for the combined biological product and its complex bacteriophage component were comparable and amounted to $10^{-6.6 \pm 0.01}$ and $10^{-6.9 \pm 0.01}$, respectively. The disc diffusion method demonstrated that the combined biological product had a more pronounced antibacterial effect on all tested strains than its individual components. The optical density values obtained

with the combined biological product were 1.5 and 2 times higher than the values observed with control samples in *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 cultures, respectively, which demonstrated the stimulating effect of the product on the normal flora. The study results suggest the compatibility of the phage and probiotic components of the combined biological product, as well as its high antimicrobial activity.

Conclusions. The novel combined biological product has high specific and non-specific antimicrobial activity, which consists in the inhibition of pathogenic bacteria growth without affecting the normal flora. The combined biological product broadens the range of medicinal products having probiotic and antibacterial effects, particularly on microorganisms resistant to antibiotics.

Key words: antibiotic resistance; metabolite type probiotics; bacteriophages and probiotics; bacteriotropic properties; antibacterial and probiotic effects; correction of dysbiosis; novel combined biological product

For citation: Neschislyayev V.A., Shilova E.G., Nikolaeva A.M., Orlova E.V. Study of a combined biological product with antibacterial and probiotic activity. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):422–430. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-422-430>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В настоящее время сегмент антибактериальных средств фармацевтического рынка Российской Федерации представлен широким спектром антибиотиков с преобладанием импортных лекарственных препаратов. Однако, несмотря на их разнообразие, российское здравоохранение испытывает большой дефицит в эффективных антимикробных средствах. Связано это в первую очередь с широким распространением антибиотикорезистентности, вызванной бесконтрольным и нерациональным использованием антибиотиков, а также ограничением их применения в медицинской практике из-за множества неблагоприятных побочных эффектов, в том числе дисбиозов различной локализации [1]. Дисбиотические состояния организма, в свою очередь, способствуют нарушению иммунного статуса и, как следствие, развитию заболеваний различной этиологии.

В поиске эффективных средств борьбы с растущей бактериальной резистентностью к антибиотикам вызывает особый интерес терапевтический потенциал композиций на основе бактериофагов и пробиотиков.

Основные достоинства препаратов бактериофагов — высокая терапевтическая эффективность в отношении патогенных микроорганизмов, связанная со специфичностью антимикробного действия. Важно, что при этом такие биопрепараты не оказывают негативного действия на нормальную микрофлору организма и обладают иммуностимулирующими свойствами [2].

В группе пробиотиков в настоящее время наиболее перспективными признаны средства на основе биологически активных экзо- и метаболитов бактерий, имеющие ряд преимуществ по сравнению с традиционными клеточными препаратами. Пробиотики метаболитного типа характеризуются выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов, т. е. способствуют иммуномодулирующему эффекту [3, 4].

С учетом актуальности проблемы был разработан и создан комплексный биопрепарат, сочетающий антибактериальную и пробиотическую активность, для терапии заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Цель работы — исследование свойств комплексного биопрепарата с антибактериальной и пробиотической активностью.

Задачи исследования:

- изучить антимикробное действие (специфическое и неспецифическое) комплексного биопрепарата;
- исследовать его пробиотическое воздействие;
- изучить антагонистические свойства комплексного биопрепарата в тесте ингибирования биолюминесценции индикаторного генномодифицированного штамма *Escherichia coli* lum+.

Материалы и методы

Объекты исследования: комплексный биопрепарат с антибактериальной и пробиотической активностью (АО «НПО «Микроген», Россия), а также две его составляющие: экзо- и метаболитный

комплекс культуральной жидкости пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [5, 6], полученный при помощи ультрафильтрации (экспериментальный биопрепарат «Микростим», Пермское НПО «Биомед», филиал АО «НПО «Микроген», Россия), и смесь очищенных стерильных фильтратов фаголизатов различных бактерий (лекарственный препарат, Пермское НПО «Биомед», филиал АО «НПО «Микроген», Россия): *Shigella flexneri* (серовары 1, 2, 3, 4, 6), *Sh. sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. enteritidis*, энтеропатогенной *Escherichia coli* различных серогрупп, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Соотношение экзометаболитного комплекса и бактериофага составило 1:9. В работе использовали штаммы бактерий, полученные за период 2019–2022 гг. из бактериологических лабораторий лечебных учреждений Пермского края. Микроорганизмы были выделены из различного клинического материала и биотопов.

Специфическую антимикробную активность оценивали по методу Аппельмана¹ (выражали в отрицательной степени десятичного разведения), а также диско-диффузионным методом² на питательном агаре Мартена в чашке Петри с использованием газонных культур: бактерии, гомологичные бактериофагам, входящим в состав комплексного бактериофага (*Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.), а также негомологичные (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*).

Газоны бактерий готовили не менее чем с тремя штаммами для каждой культуры. Диски предварительно пропитывали соответствующими образцами комплексного биопрепарата и его компонентов. Диффузия биопрепарата в агар приводила к формированию зоны подавления роста тест-культуры вокруг дисков. Степень антимикробной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста тест-штамма.

Антагонистическую активность исследуемых препаратов определяли в тесте ингибирования биолюминесценции генномодифицированного индикаторного штамма *E. coli lum+* [7]. К 0,5 мл исследуемого препарата добавляли 0,5 мл бактериальной суспензии тест-штамма и выдерживали при температуре 22±2 °С в течение 24 ч. В качестве контроля использовали бактериальную суспензию индикаторной культуры в стерильном физиологическом растворе; в качестве препарата срав-

нения — нативный экзометаболитный комплекс пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3. Применение данного препарата обусловлено его известным воздействием на индикаторный штамм. Для оценки динамики свечения проводили замеры в течение 14 ч с интервалом в 2 ч при помощи люминометра «Биотокс-10 М» (ООО «НТЦ «Экологическая Перспектива», Россия). Результат выражали количественно — в виде индекса антибактериальной активности (ИАА), численно равного относительному (%) изменению свечения тест-штамма. Это безразмерная величина, рассчитываемая по формуле:

$$\text{ИАА} = \frac{I_k - I_o}{I_o} \times 100, \quad (1)$$

где I_k и I_o — интенсивность свечения контроля и опыта соответственно (при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с тест-объектом).

Пробиотическую активность комплексного биопрепарата и его составляющих оценивали в отношении модельных микроорганизмов нормофлоры, включая штаммы *Bifidobacterium bifidum* 1 и *L. plantarum* 8P-A3, в эксперименте культивирования клеток. Для определения влияния исследуемых препаратов на рост клеток в 0,5% стерильный раствор глюкозы (24 мл) вносили 3 мл исследуемого образца и такой же объем жидкой культуры лакто- или бифидобактерий, предварительно подготовленной путем регидратации препарата «Лактобактерин сухой» или «Бифидумбактерин сухой» (АО «НПО «Микроген», Россия) в 5 мл 0,9% стерильного раствора натрия хлорида. Полученный комплекс выдерживали в термостате при температуре 37±1 °С в течение 48 ч. В качестве контроля вместо препарата использовали физиологический раствор в аналогичном объеме.

Рост бактериальных культур оценивали по изменению показателя оптической плотности (OD) тестовых культур на спектрофотометре UV-2700 Shimadzu 50061-12 (Япония) в кювете, толщина слоя культуры — 3 мм, длина волны — 540 нм. Уровень стимуляции роста бактериальных культур выражали с помощью коэффициента стимуляции роста (КС роста) по показателям оптической плотности:

$$\text{КС}_{\text{роста}} = \frac{\text{OD}_{\text{О.кон}} - \text{OD}_{\text{О.нач}}}{\text{OD}_{\text{К.кон}} - \text{OD}_{\text{К.нач}}}, \quad (2)$$

где $\text{OD}_{\text{О.кон}}$ — усредненный конечный показатель оптической плотности тестовых культур в опытной пробе; $\text{OD}_{\text{О.нач}}$ — усредненный началь-

¹ ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

² МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

ный показатель оптической плотности тестовых культур в опытной пробе; $OD_{K,кон}$ — усредненный конечный показатель оптической плотности тестовых культур в контрольной пробе, $OD_{K,нач}$ — усредненный начальный показатель оптической плотности тестовых культур в контрольной пробе.

Полученные результаты обрабатывали при помощи методов вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе работы исследовали специфическую антимикробную активность комплексного биопрепарата и его составляющих в отношении гомологичных комплексному бактериофагу штаммов методом Аппельмана. Показатель специфической антимикробной активности (среднее значение титра по препарату) исследуемых материалов:

комплексный препарат — $10^{-6,6 \pm 0,01}$;

комплексный бактериофаг — $10^{-6,9 \pm 0,01}$;

экзометаболитный пробиотик — менее $10^{-1,0 \pm 0,00}$.

Выявлено, что показатели специфической активности комплексного биопрепарата и входящего в его состав поликомпонентного бактериофага сопоставимы. Показатель специфической антимикробной активности комплексного биопрепарата по значению титра составил $10^{-6,6 \pm 0,01}$, что свидетельствует о сохранении данной ак-

тивности на высоком уровне, а также, что немаловажно, о совместимости фагового и пробиотического компонентов биопрепарата.

Результаты исследований специфической антимикробной активности диско-диффузионным методом наглядно продемонстрировали, что комплексный биопрепарат обладает более выраженным антибактериальным действием по сравнению с бактериофагом и экзометаболитами пробиотической культуры (табл. 1). Степень антимикробной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста тест-штамма.

При анализе результатов исследований специфической антимикробной активности диско-диффузионным методом (табл. 1) наиболее высокие показатели выявлены у комплексного препарата. При этом наибольшая зона ингибирования бактериального роста отмечена для клинических штаммов *Shigella* spp. ($19,4 \pm 0,1$ мм), *P. aeruginosa* ($18,9 \pm 0,4$ мм) и *Staphylococcus* spp. ($18,7 \pm 0,1$ мм). При использовании в эксперименте поликомпонентного бактериофага зона ингибирования роста оказалась меньше: для вышеуказанных представителей грамположительных аэробных кокков рода *Salmonella* (группы А–D) — $14,9 \pm 1,5$ мм, для грамотрицательных палочковидных бактерий *Shigella* spp. — $15,8 \pm 1,1$ мм, для представителей *Pseudomonas aeruginosa* — $15,3 \pm 1,5$ мм.

Подтверждено, что важно, влияние комплексного биопрепарата на негомологичные комплексному бактериофагу штаммы: *K. pneumoniae*,

Таблица 1. Специфическое антимикробное действие исследуемого комплексного биопрепарата и его компонентов (диско-диффузионный метод)

Table 1. Specific antimicrobial activity of the combined biological product (disk diffusion method)

Бактериальные тест-культуры <i>Bacterial test cultures</i>	Зона ингибирования роста бактерий, мм <i>Growth inhibition zone, mm</i>		
	Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	$6,3 \pm 0,2$	$14,9 \pm 1,0$	$18,7 \pm 0,1$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$6,7 \pm 0,2$	$15,3 \pm 1,5$	$18,9 \pm 0,4$
<i>Escherichia coli</i>	$6,6 \pm 0,2$	$15,1 \pm 1,3$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Proteus</i> spp.	$6,5 \pm 0,2$	$15,0 \pm 1,0$	$18,5 \pm 0,3$
<i>Enterococcus</i> spp.	$6,7 \pm 0,2$	$15,2 \pm 1,1$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Salmonella</i> (группы А–D / <i>Groups A–D</i>)	$6,3 \pm 0,2$	$14,9 \pm 1,5$	$18,6 \pm 0,2$
<i>Shigella</i> spp.	$6,7 \pm 0,2$	$15,8 \pm 1,1$	$19,4 \pm 0,1$
Среднее значение <i>Mean</i>	$6,6 \pm 0,2$	$15,2 \pm 1,2$	$18,8 \pm 0,2$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Неспецифическое антибактериальное действие комплексного биопрепарата (ингибирование бактериального роста)
Table 2. Non-specific antimicrobial activity of the combined biological product (bacterial growth inhibition)

Бактериальные тест-культуры <i>Bacterial test cultures</i>	Среднее значение зоны ингибирования, мм <i>Mean inhibition zone, mm</i>		
	Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,5±0,2	Отсутствие зоны ингибирования <i>No zone of inhibition</i>	7,1±0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6,5±0,2		7,1±0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6,5±0,2		7,1±0,2
Среднее значение <i>Mean</i>	6,5±0,2		7,1±0,2

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 3. Влияние комплексного биопрепарата на накопление биомассы пробиотических культур (тест ингибирования биолюминесценции)
Table 3. Influence of the combined biological product on probiotic biomass accumulation (bioluminescence inhibition assay)

Исследуемый материал <i>Test sample</i>	Изменение оптической плотности (OD, λ=540 нм) <i>Optical density changes (OD, λ=540 nm)</i>			
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3		<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	
	Опыт/Контроль <i>Test/Control</i>	КС _{роста} <i>SF_{growth}</i>	Опыт/Контроль <i>Test/Control</i>	КС _{роста} <i>SF_{growth}</i>
Комплексный биопрепарат <i>Combined biological product</i>	0,190±0,02 / 0,085±0,02	2,23	0,140±0,02 / 0,093±0,01	1,50
Комплексный бактериофаг <i>Complex bacteriophage</i>	0,102±0,01 / 0,085±0,02	1,20	0,097±0,02 / 0,093±0,01	1,04
Экзометаболитный пробиотик <i>Exometabolite probiotic</i>	0,230±0,02 / 0,085±0,02	2,70	0,182±0,02 / 0,093±0,01	1,95

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КС_{роста} — коэффициент стимуляции роста бактериальных культур (по показателям оптической плотности).
Note. SF_{growth} — bacterial growth stimulation factor (based on optical density values).

Y. enterocolitica и *Acinetobacter baumannii* (табл. 2). Из представленных в таблице 2 данных видно, что комплексный препарат также обладает достоверно более высокой (по сравнению с экзометаболитами пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3) антибактериальной активностью, не связанной со специфичностью комплексного бактериофага.

На следующем этапе работы оценивали влияние комплексного биопрепарата на накопление биомассы (рост) представителей нормофлоры (табл. 3).

Данные по культивированию микроорганизмов нормофлоры (*B. bifidum* 1, *L. plantarum* 8P-A3) показали, что данные бактерии способны к ро-

сту в присутствии всех исследуемых препаратов. Более выраженный рост наблюдался в процессе культивирования бактерий с добавлением в питательную среду экзометаболитов пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3. В опытах с комплексным бактериофагом оптическая плотность культуры бактерий была значительно ниже. Однако после инкубации культур *L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1 с добавлением комплексного биопрепарата показатель прироста оптической плотности тестовых культур статистически отличался от контрольных значений и превышал контрольный показатель в 2 раза для *L. plantarum* 8P-A3 и в 1,5 раза для *B. bifidum* 1,

что свидетельствовало о стимулировании роста нормофлоры в этих вариантах опыта.

Вызывает интерес исследование всей совокупности антагонистических свойств, помимо специфических, данного комплексного биопрепарата. Провести экспрессную и количественную оценку данных параметров позволяет тест ингибирования клеточной биолуминесценции (рис. 1) [8].

Исследования антагонистической активности препаратов в отношении модельного тест-штамма энтеробактерий показали, что все образцы обладают значительным ингибированием биолуминесценции *E. coli lum+*. Нативный экзометаболитный комплекс (рис. 1, прямая 4) с первых часов экспозиции максимально подавлял свечение тест-штамма. Образец, разведенный до уровня содержания экзометаболитов в комплексном препарате (рис. 1, кривая 3), стабильно ингибировал свечение *E. coli lum+* на протяжении всего времени экспозиции: угнетение свечения – 70%.

Комплексный биопрепарат (рис. 1, кривая 1) и комплексный бактериофаг (рис. 1, кривая 2) проявляли схожую динамику ингибирования свечения, которая характеризовалась постепенным увеличением ИАА, максимум которого (угнетение свечения – 99,98 и 99,99%) наблюдали к 8 и 14 ч экспозиции соответственно. О сочетании эффекте комплексного биопрепарата свидетельствовали следующие показатели: более ранний выход на максимальный уровень подавления свечения по сравнению с бактериофагом, а также более выраженное антимикробное

действие по сравнению с разведенным экзометаболитным комплексом.

Комплексный биопрепарат в большей степени угнетал свечение *E. coli lum+* в первые часы эксперимента, его показатели превосходили практически в 5 раз таковые для комплексного бактериофага, очевидно, за счет экзометаболитной составляющей. Последующее увеличение ИАА комплексного бактериофага обусловлено воздействием специфических фаголизатов энтеробактерий, входящих в состав бактериофага.

Закключение

Анализ результатов показал, что комплексный биопрепарат, включающий в себя пробиотик на основе экзометаболитов лактобактерий и комплексный бактериофаг, обладает высокой антимикробной активностью, проявляющейся в инактивировании бактериальных клеток патогенных культур (подавление их роста), при отсутствии ингибирующего действия в отношении микроорганизмов нормофлоры. Антибактериальное действие комплексного препарата наблюдалось в отношении штаммов бактерий, как гомологичных, так и не гомологичных комплексному бактериофагу, что свидетельствует о его более высоком антибактериальном потенциале.

Разработанный комплексный биопрепарат с сочетанным антибактериальным и пробиотическим действием способен эффективно пополнить пул биотехнологических препаратов, представленных на российском фармацевтическом рынке.

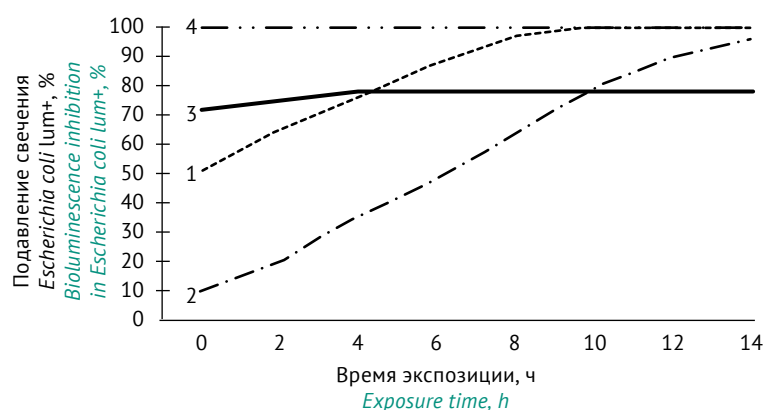


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Неспецифическая антимикробная активность (в тесте ингибирования биолуминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli lum+*): 1 – комплексный биопрепарат; 2 – комплексный бактериофаг; 3 – экзометаболиты пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (в разведении 1:9); 4 – нативный экзометаболитный комплекс пробиотической культуры *L. plantarum* 8P-A3.

Fig. 1. Non-specific antimicrobial activity (bioluminescence inhibition assay using the indicator strain *Escherichia coli lum+*): 1, combined biological product; 2, complex bacteriophage; 3, exometabolites of the *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 probiotic culture (1:9 dilution); 4, intact exometabolite complex of the *L. plantarum* 8P-A3 probiotic culture.

Литература/References

1. Ефименко ТА, Терехова ЛП, Ефременкова ОВ. Современное состояние проблем антибиотикорезистентности патогенных бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019;64(5–6):64–8. Efimenko TA, Terekhova LP, Efremenkova OV. Current state of the problem of antibiotic resistance of pathogens. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2019;64(5–6):64–8 (In Russ.). EDN: [GJTLZH](#)
2. Назаров ПА. Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018;(1):5–15. Nazarov PA. Alternatives to antibiotics: phage lytic enzymes and phage therapy. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2018;(1):5–15 (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.002>
3. Трухманов АС, Румянцева ДЕ. Перспективы применения метабиотиков в комплексной терапии заболеваний кишечника. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):51–6. Trukhmanov AS, Rumyantseva DE. Perspective for the use of metabiotics in the complex therapy of intestinal diseases. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):51–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.8.200282>
4. Шендеров БА. Метабиотики — новая технология профилактики заболеваний, связанных с микроэкологическим дисбалансом человека. *Вестник восстановительной медицины*. 2017;(4):40–9. Shenderov BA. Metabiotics—novel prophylactic technology of diseases associated with micro-ecological imbalance of human being. *Bulletin of Rehabilitation Medicine*. 2017;(4):40–9 (In Russ.). EDN: [ZFOTLF](#)
5. Несчисляев ВА, Чистохина ЛП. Способ получения биологического стимулятора. Патент Российской Федерации № 2224018; 2004. Neschislyaev VA, Chistokhina LP. Method for preparing a biological stimulating agent. Patent of the Russian Federation No. 2224018; 2004 (In Russ.). EDN: [PEVCZU](#)
6. Шилова ЕГ, Пустобаева МС, Красильникова АН, Хохрякова МД. Методы идентификации карбоновых кислот в составе экзометаболита пробиотической культуры *Lactobacillus plantarum* 8p-a3. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2022;24(6):89–93. Shilova EG, Pustobaeva MS, Krasilnikova AN, Hohryakova MD. Methods of identification of carboxylic acids in the composition of the exometabolite of the probiotic culture *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2022;24(6):89–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6-89-93>
7. Несчисляев ВА, Пшеничнов РА, Арчакова ЕГ, Чистохина ЛП, Фадеева ИВ. Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент Российской Федерации № 2187801; 2002. Neschislyaev VA, Pshenichnov RA, Archakova EG, Chistokhina LP, Fadeeva IV. Method of assay of antagonistic activity of probiotics. Patent of the Russian Federation No. 2187801; 2002 (In Russ.). EDN: [QSTGQZ](#)
8. Хохрякова МД, Шилова ЕГ, Несчисляев ВА, Федорова ТВ, Орлова ЕВ, Мокин ПА. Расширение сферы применения теста ингибирования биолуминесценции. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2022;24(4):138–42. Hohryakova MD, Shilova EG, Neschislyaev VA, Fedorova TV, Orlova EV, Mokin PA. Expanding the scope of the bioluminescence inhibition test. *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2022;24(4):138–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-4-138-142>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.А. Несчисляев** — создание концепции, обоснование концепции исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач), организация, координирование этапов исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Е.Г. Шилова** — проведение экспериментального исследования, разработка дизайна и концепции экспериментального исследования, сбор и систематизация данных, пробоподготовка образцов, проведение инструментальных исследований (исследования бактериотропной активности исследуемых образцов), работа с графическим материалом, анализ и систематизация экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.М. Николаева** — анализ и обобщение результатов исследования, формулировка выводов, критический пересмотр и редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Е.В. Орлова** — редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.A. Neschislyaev** elaborated and substantiated the study concept (formulated the idea, aim, and objectives), organised and coordinated the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **E.G. Shilova** designed, conceptualised, and conducted the experimental study; collected and collated data; prepared samples; studied the bacteriotropic activity of the test samples; worked with the graphical material, analysed and collated experimental data; and drafted the manuscript. **A.M. Nikolaeva** analysed and summarised the study results, formulated the conclusions, critically reviewed and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. **E.V. Orlova** edited and revised the manuscript.

Об авторах / Authors

Несчисляев Валерий Александрович, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>

neschislavew@gmail.ru

Шилова Екатерина Геннадьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0001-6649>

eket1981@mail.ru

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

nikolaeva.alla@gmail.com

Орлова Екатерина Владимировна, д-р фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0401-2546>

e.v.orlova@microgen.ru

Поступила 06.10.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Valery A. Neschislyayev, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>

neschislavew@gmail.ru

Ekaterina G. Shilova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0001-6649>

eket1981@mail.ru

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

nikolaeva.alla@gmail.com

Ekaterina V. Orlova, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0401-2546>

e.v.orlova@microgen.ru

Received 6 October 2022

Revised 20 February 2023

Accepted 13 September 2023