

## In vitro detection of antagonistic activity levels of *Enterococcus faecium* isolates and selection prospective probiotic strains

O. Chechet | V. Kovalenko | O. Gorbatyuk | O. Gaidei | N. Kuryata | I. Musiets | D. Ordynska | L. Shalimova | G. Buchkovska

### Article info

Correspondence Author  
O. Gorbatyuk  
E-mail:  
[goroliva@ukr.net](mailto:goroliva@ukr.net)

State Research Institute  
of Laboratory Diagnostics  
and Veterinary Sanitary  
Examination,  
st. Donetsk, 30, Kyiv,  
03151, Ukraine

**Citation:** Chechet, O., Kovalenko, V., Gorbatyuk, O., Gaidei, O., Kuryata, N., Musiets, I., Ordynska, D., Shalimova, L., & Buchkovska, G. (2023). In vitro detection of antagonistic activity levels of *Enterococcus faecium* isolates and selection prospective probiotic strains. *Scientific Progress & Innovations*, 26 (1), 90–95. doi: 10.31210/spi2023.26.01.14

In the modern conditions of the development of commercial poultry farming, the development of new biological prophylactic drugs for the correction of microbiocenosis and the improvement of non-specific immunity of poultry is given priority. The materials of the article present the results of studies of the antagonistic properties of 5 isolates of *Enterococcus faecium*, isolated from the caecum of the large intestine with contents collected from chickens and broiler chickens from poultry farms of Ukraine for active monitoring in accordance with the state program of the Procedure for Supervision (Active Monitoring) of Antimicrobial Resistance zoonotic and commensal bacteria in veterinary medicine and identified to species. The studies were carried out by two diffusion methods - delayed antagonism and agar blocks in order to confirm the reliability of the obtained results. 2 strains of *Enterococcus faecium* – Efm-3 and Efm-5 were found to have very high and high levels of antagonism after the interaction of the strains with gram-negative and gram-positive test bacteria *Escherichia coli* ATSS 25922 (diameters of growth inhibition zones  $39.4 \pm 1.3/36.4 \pm 0.3$  and  $42.2 \pm 2.7/39.4 \pm 2.7$  mm according to strains and methods), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ( $29.0 \pm 1.3/28.4 \pm 0.7$  and  $29, 2 \pm 1.3/39.4 \pm 2.7$ ), *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 ( $17.2 \pm 0.7/17.2 \pm 1.7$  and  $28.2 \pm 0.7/28.6 \pm 0, 7$ ) and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ( $28.2 \pm 0.07/28.4 \pm 0.7$  and  $35.2 \pm 0.7/34.2 \pm 0.17$ ), which are in the range of values of high antagonism. *Enterococcus faecium* Efm-3 and Efm-5 strains were selected as promising probiotic microorganisms due to their avirulent properties and high level of antagonistic activity. The obtained data confirm the possibility of correcting the immune response with the help of developed complex probiotic preparations with selected promising strains of *Enterococcus faecium* in the composition, aimed at normalizing the intestinal microflora, strengthening the body's immune functions, increasing the parameters of poultry preservation and the quality of the obtained products.

**Keywords:** probiotic preparations, antagonistic activity, *Enterococcus faecium*, test cultures, method of delayed antagonism, method of agar blocks.

## Виявлення *in vitro* рівнів антагоністичної активності ізолятів *Enterococcus faecium* та відбір перспективних пробіотичних штамів

О. М. Чечет | В. Л. Коваленко | О. І. Горбатюк | О. С. Гейдей | Н. В. Курята | І. В. Мусієць | Д. О. Ординська | Л. О. Шалімова | Г. А. Бучковська

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

У сучасних умовах розвитку промислового птахівництва, розробленню нових біологічних профілактичних препаратів для корекції мікробіоценозу та підвищення неспецифічного імунітету птиці надається пріоритетне значення. В матеріалах статті представлені результатами досліджень антагоністичних властивостей 5 ізолятів *Enterococcus faecium*, виділених із сліпих відростків товстого кишечника з вмістом, відібраного від курей та курчат-бройлерів із птахогосподарств України за проведення активного моніторингу згідно державної програми з Порядку проведення нагляду (активного моніторингу) за протимікробною резистентністю зоонозних та коменсальних бактерій у ветеринарній медицині та ідентифікованих до виду. Дослідження були виконані двома дифузійними методами – відтермінованого антагонізму та агарових блоків з метою підтвердження достовірності одержаних результатів. Встановлено у 2 штамів *Enterococcus faecium* – Efm-3 і Efm-5 дуже високий та високий рівні антагонізму після взаємодії штамів з грамнегативними і грампозитивними тестовими бактеріями *E. coli* ATCC 25922 (діаметри зон інгібування росту  $39,4 \pm 1,3/36,4 \pm 0,3$  і  $42,2 \pm 2,7/39,4 \pm 2,7$  мм відповідно до штамів і методів), *P. aeruginosa* ATCC 15442 ( $29,0 \pm 1,3/28,4 \pm 0,7$  і  $29,2 \pm 1,3/39,4 \pm 2,7$ ), *S. typhimurium* ATCC 29630 ( $17,2 \pm 0,7/17,2 \pm 1,7$  і  $28,2 \pm 0,7/28,6 \pm 0,7$ ) і *S. aureus* ATCC 6538 ( $28,2 \pm 0,07/28,4 \pm 0,7$  і  $35,2 \pm 0,7/34,2 \pm 0,17$ ), які знаходяться в діапазоні значень високого антагонізму. Штами Efm-3 і Efm-5 *Enterococcus faecium* відібрано в якості перспективних пробіотичних мікроорганізмів, завдячуючи авірулентним властивостям та показникам високого рівня антагоністичної активності. Одержані дані засвідчують можливість корекції імунної відповіді за допомогою розроблених комплексних пробіотичних препаратів у складі з відібраними перспективними штамми *Enterococcus faecium*, направлених на нормалізацію мікрофлори кишечника, посилення імунних функцій організму, підвищення показників збереженості птиці та якості одержаної продукції.

**Ключові слова:** пробіотичні препарати, антагоністична активність, *Enterococcus faecium*, тестові культури, метод відтермінованого антагонізму, метод агарових блоків.

**Бібліографічний опис для цитування:** Чечет О. М., Коваленко В. Л., Горбатюк О. І., Гейдей О. С., Курята Н. В., Мусієць І. В., Ординська Д. О., Шалімова Л. О., Бучковська Г. А. Виявлення *in vitro* рівнів антагоністичної активності ізолятів *Enterococcus faecium* та відбір перспективних пробіотичних штамів. *Scientific Progress & Innovations*. 2023. № 26 (1). С. 90–95.

## Вступ

У сучасних умовах розвитку сільсько-господарського виробництва, зокрема птахівництва, розроблення нових біологічних профілактичних препаратів, які могли б гарантувати зменшення втрат поголів'я і підвищення його стійкості до хвороб різної етіології є актуальною проблемою сьогодення. Підвищення збереженості курчат у ранньому віці, забезпечення високої інтенсивності їх росту на всіх стадіях вирощування та одержання якісної продукції є одним із головних пріоритетів розвитку галузі. В країнах ЄС, як і в Україні, досліджують можливості корекції імунної відповіді, тому створенню пробіотичних препаратів, направлених на нормалізацію мікрофлори кишечника і посилення імунних функцій організму, зокрема птиці, приділяється значна увага [1–6].

Нормофлора шлунково-кишкового тракту людини, тварин, птиці представлена численними популяціями мікроорганізмів, які заселяють органи і системи організму, підтримуючи біохімічну, метаболічну та імунологічну рівновагу макроорганізму, необхідну для забезпечення його здоров'я [7, 8].

Останнім часом у Європі спостерігається тенденція до зростання проявів ентерококової інфекції, головним чином за рахунок передачі через харчові продукти тваринного походження [9].

Відомо, що ентерококова інфекція є значною і постійною загрозою щодо виникнення уражень майже у всіх органах і системах організму. Їх особливістю є висока природна резистентність до впливу фізико-хімічних факторів та антибактеріальних хіміопрепаратів. Небезпека, яку вони несуть для організму людини, тварин і птиці, полягає у їх здатності до швидкого набуття, а далі накопичення й розмноження позахромосомного генетичного матеріалу, який кодує фактори резистентності до антибіотиків. Тому, ентерококи володіють високою здатністю до виживання в стресових умовах навколишнього середовища та в організмі тварин і птиці [10, 11]. Саме такі їх властивості викликають інтерес науковців щодо використання ентерококів для виготовлення біологічних препаратів, зокрема пробіотичних.

Проте, при цьому низка вчених висловлюють серйозне занепокоєння щодо використання бактерій роду *Enterococcus* у складі пробіотичних препаратів і наголошують на тому, що потрібно проводити поглиблені дослідження для відбору безпечних штамів [12].

Але, як показав практичний досвід, імпорتنі препарати “Лінекс” та «Біфіформ», створені на основі безпечних штамів бактерій роду *Enterococcus*, показали високу ефективність при нормалізації мікробіоти шлунково-кишкового тракту і набули широкого застосування у практиці гуманної медицини, в Україні зокрема [13].

## Мета дослідження

Метою роботи було встановити *in vitro* та охарактеризувати рівень антагоністичної активності, виділених від птиці, ізолятів *Enterococcus faecium* після їхньої взаємодії зі стандартними тестовими культурами грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів та відібрати найбільш перспективні штамми для конструювання пробіотичного препарату «Біомагн».

## Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології (ЛДЗБЕ) науково-дослідного мікробіологічного відділу (НДМВ) Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Патологічний матеріал (сліпі відростки товстого кишечника з вмістом) було відібрано від курей та курчат-бройлерів за проведення активного моніторингу згідно державної програми з Порядку проведення нагляду (активного моніторингу) за протимікробною резистентністю зоонозних та коменсальних бактерій у ветеринарній медицині за 2021 рік із птахогосподарств України: від курей – Чернігівська обл., Чернігівський р-н, смт Березна, ТОВ «АгроЕфект»; Тернопілька обл., Зборівський р-н, м. Гарбузів, ПАП «Агропродсервіс-Вест»; від курчат-бройлерів – Волинська обл., Луцький р-н, с. Холонів, ТзОВ «Птахокомплекс «Губин» і виділено 11 ізолятів бактерій роду *Enterococcus*, із яких 5 штамів було ідентифіковано до виду *Enterococcus faecium* – Efm-1, Efm-2 Efm-3 Efm-4, Efm-5. У ідентифікованих штамів *Enterococcus faecium* було підтверджено їх авірулентність за постановки біопроби на курчатах та надалі використано для визначення рівня антагоністичної активності і відбору перспективних пробіотичних культур.

В якості індикаторних використовували грамнегативні тестові культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та грампозитивну тестову культуру *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, взяті із Музею культур тестових мікроорганізмів ЛДЗБЕ. Попередньо всі тестові культури пройшли перевірку на відповідність основним типовим властивостям щодо кожного виду та були допущені до постановки основного дослідження.

Визначення рівня антагоністичної активності проводили дифузійними методами: методом відтермінованого антагонізму на чашках Петрі з 2,0 % м'ясо-пептонним агаром (МПА) та методом агарових блоків у нашій модифікації [14].

Перед постановкою основного дослідження проводили підтитрування дослідних культур *Enterococcus faecium* за загальноприйнятою методикою послідовних розведень з метою одержання росту поодиноких колоній після посіву бактеріальної суспензії на площині МПА. Для забезпечення таких умов

бактеріальна суспензія *Enterococcus faecium* була використана у концентрації  $10^3$  КУО/см<sup>3</sup> [15].

Висіану на чашки Петрі з МПА бактеріальну суспензію *Enterococcus faecium* інкубували за температури  $37\pm 1$  °С протягом 24 год. Після термостатування у чашки Петрі з вирослими поодинокими колоніями дослідного ізоляту наносили хлороформ в об'ємі (2–3 см<sup>3</sup>) на всю площину чашки, витримували протягом 5 хв, зливали залишки та підсушували поверхню МПА з макроколоніями в асептичних умовах протягом 30 хв.

Поряд проводили посіви добових тестових культур мікроорганізмів *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 29630, *S. aureus* ATCC 6538 на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та підщували їх у термостаті за температури  $37\pm 1$  °С протягом 6 год. В пробірки в асептичних умовах розливали по 5,0 см<sup>3</sup> розплавленого і охолодженого до температури  $45\pm 1$  °С 0,7 % напіврідкого поживного агару (НРА). Відразу у напіврідкий агар вносили в об'ємі по 0,1 см<sup>3</sup> одержані бульйонні тест-культури, швидко і ретельно перемішували суміш та розливали на підсушені чашки Петрі з колоніями дослідних мікроорганізмів *Enterococcus faecium*, ретельно розподіляючи по поверхні МПА. Після повного застигання суміші НРА з відповідною тестовою культурою, чашки переносили до термостату та інкубували посіви за температури  $37\pm 1$  °С протягом 24 год.

Кожний дослідний штам *Enterococcus faecium* з відповідними тестовими культурами бактерій був досліджений триразово.

Поряд з основним дослідом ставили контролі росту тестових культур бактерій аналогічно, але без посіву дослідних штамів *Enterococcus faecium*.

Облік результатів проводили, визначаючи діаметр зон інгібування росту або констатуючи її відсутність у тестових бактерій навколо макроколоній дослідних мікроорганізмів *Enterococcus faecium*. Рівень антагоністичної активності дослідних штамів *Enterococcus faecium* вважали умовно низьким, якщо діаметр зони затримки росту коливався у межах від 7 до 14 мм; середній рівень – в межах 14–26 мм; високий рівень – в межах 27–36 мм та дуже високий рівень – більше 36 мм за інтенсивного росту індикаторних тестових бактерій у відповідних контролях.

Після обліку результатів з визначення рівня антагоністичної активності, одержані показники було оброблено статистично [16].

Для підтвердження достовірності результатів основного досліді, поставленого методом відтермінованого антагонізму, паралельно нами був застосований методом агарових блоків у нашій модифікації [15].

Агарові блоки виготовляли шляхом внесення бактеріальної суспензії *Enterococcus faecium* в розплавлений та охолоджений до температури  $45\pm 1$  °С МПА у співвідношенні 1:10 (1 частина розведеної бактеріальної суспензії та 9 частин агаризованого середовища), ретельно перемішували та розливали в стерильні чашки Петрі по 15,0 см<sup>3</sup> у кожену. Чашки залишали до повного застигання середовища та проводили культивування у термостаті за темпе-

ратури  $37\pm 1$  °С протягом 24 год. Після культивування в асептичних умовах із засіяного агару за допомогою стерильного пробійника з діаметром 9 мм вирізали агарові блоки.

Добові тестові культури мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 29630 та *S. aureus* ATCC 6538 одержували шляхом посівів вище означених культур на МПА з культивуванням у термостаті за температури  $37\pm 1$  °С протягом 24 год. Після культивування в асептичних умовах проводили змив відповідних тестових бактерій стерильним фізіологічним розчином та виготовляли бактеріальну суспензію з концентрацією 0,5 ОО за оптичним стандартом каламутності Мак-Фарланда. Одержані бактеріальні суспензії висівали кожену окремо на чашки Петрі з МПА, ретельно розтирали по всій площині середовища для майбутнього отримання якісного газону тестових бактерій. Чашки з посівами залишали за кімнатної температури протягом 15 хв для дифузії в агар відповідних тестових мікроорганізмів. Далі на поверхню засіяних чашок накладали по 3 вирізані агарові блоки з бактеріями *Enterococcus faecium*, рівновіддалено один від одного та культивували за температури  $37\pm 1$  °С протягом 24 год.

Облік результатів проводили за величиною діаметрів зон пригнічення росту тестових культур мікроорганізмів аналогічно, як за методу відтермінованого антагонізму.

За закінчення основних дослідів, поставлених обома дифузійними методами, було проведено порівняльний аналіз одержаних результатів для кожного дослідного штаму *Enterococcus faecium* та відібрані перспективні пробіотичні мікроорганізми для подальшої перспективної роботи.

## Результати та їх обговорення

Результати досліджень здійснені методом відтермінованого антагонізму 5 штамів *Enterococcus faecium* стосовно встановлення рівня антибактеріальної активності щодо тестових мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 засвідчили високий її рівень у 3 штамів: Efm-1, Efm-2 Efm-4, що становило 60,0 % від загальної кількості дослідних ізолятів. У 2 штамів: Efm-3 і Efm-5 встановлено дуже високий рівень антагоністичної активності, що було підтверджено величиною діаметрів зон інгібування росту *E. coli* ATCC 25922 в межах  $39,4\pm 0,3$  та  $40,2\pm 1,7$  мм відповідно та знаходилися в діапазоні значень такого рівня антагонізму.

Дослідження *in vitro* рівнів антагоністичної активності дослідних штамів *Enterococcus faecium* стосовно *P. aeruginosa* ATCC 15442 показали незначну кілерну дію та підтвердили не надто високий рівень антагоністичної активності. Із п'яти лише 3 штами – Efm-1, Efm-3, Efm-5, за величиною показників ( $26,6\pm 1,3$ ;  $29\pm 1,3$ ;  $29\pm 1,3$  відповідно), відповідали критеріям високої антагоністичної активності, інші – мали середній рівень антагонізму за взаємодії з псевдомонадами, але при цьому за інтенсивного росту тестової культури у контролях росту.

Дослідження *in vitro* рівнів антагоністичної активності дослідних штамів *Enterococcus faecium* стосовно *P. aeruginosa* ATCC 15442 показали незначну кілерну дію та підтвердили не надто високий рівень антагоністичної активності. Із п'яти лише 3 штами – Efm-1, Efm-3, Efm-5, за величиною

показників (26,6±1,3; 29±1,3; 29±1,3 відповідно), відповідали критеріям високої антагоністичної активності, інші – мали середній рівень антагонізму за взаємодії з псевдомонадами, але при цьому за інтенсивного росту тестової культури у контролях росту (табл. 1).

**Таблиця 1**

Результати досліджень методом відтермінованого антагонізму рівня антагоністичної активності ізолятів *Enterococcus faecium* за взаємодії з грампозитивними і грамнегативними тестовими бактеріями, M±m, мм, n=5

№ з/п	Назва мікроорганізму	Назва штаму	Культури тестових мікроорганізмів							
			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>S. typhimurium</i> ATCC 29630		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
			діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності
1.	<i>Enterococcus faecium</i>	Efm-1	29±1,3	В	26,6±1,3	В	12±0,7	Н	24±0,7	С
2.	– «» –	Efm-2	32,4±0,3	В	22±1,3	С	14±0,7	Н	20±0,7	С
3.	– «» –	<b>Efm-3</b>	<b>39,4±1,3</b>	<b>Дв</b>	<b>29,0±1,3</b>	<b>В</b>	<b>17,2±0,7</b>	<b>С</b>	<b>28,2±0,7</b>	<b>В</b>
4.	– «» –	Efm-4	27±0,3	В	20,0±1,3	С	14±0,7	Н	21±0,7	С
5.	– «» –	<b>Efm-5</b>	<b>40,2±2,7</b>	<b>Дв</b>	<b>29,2±1,3</b>	<b>В</b>	<b>28,2±0,7</b>	<b>В</b>	<b>35,2±0,7</b>	<b>В</b>

Примітки: рівні антагоністичної активності – «Н» – низький; «С» – середній; «В» – високий; «Дв» – дуже високий.

За результатами досліджень рівень антагонізму серед штамів *Enterococcus faecium* за взаємодії з тестовою культурою *S. typhimurium* ATCC 29630, виявився не надто значним. Із п'яти лише штам Efm-5 проявляв антагоністичну дію, яка відповідала параметрам високого рівня антагонізму з показниками 28,2±0,7 мм інгібування росту тестової культури. Штам *Enterococcus faecium* Efm-5 щодо *S. typhimurium* ATCC 29630 проявляв середню антагоністичну дію з зоною інгібування росту 17,2±0,7 мм. У всіх інших штамів зона інгібування росту була меншою і знаходилася у межах, які відповідали низькому рівню антагонізму.

Високі рівні антагоністичної активності за досліджень *in vitro* ізолятів *Enterococcus faecium* щодо дії на грампозитивні тестові бактерії *S. aureus* ATCC 6538 були виявлені у штамів Efm-3 і Efm-5 (28±0,7 мм діаметр зони інгібування росту і 35,2±0,7 мм відповідно), поряд з інтенсивним ростом тестової культури у контролі. Всім іншим дослідним штамам *Enterococcus faecium* був притаманний середній рівень антагоністичної активності, що засвідчено одержаними показниками.

Таким чином, за встановлення рівня антагоністичної активності відповідно до показників діаметру зон інгібування росту тестових культур серед п'яти досліджених штамів *Enterococcus faecium* в якості пробіотичних виділено 2 штами – Efm-3 і Efm-5, як такі що відрізнялися дуже високою антагоністичною активністю до тестової культури *E. coli* ATCC 25922 (39,4±0,3 та 40,2±1,7 мм

відповідно); високим рівнем антагонізму до *P. aeruginosa* ATCC 15442 (26,6±1,3; 29±1,3; 29±1,3 мм відповідно) та *S. aureus* ATCC 6538 (28±0,7 мм діаметр зони інгібування росту і 35,2±0,7 мм відповідно); високим та середнім рівнями антагоністичних властивостей щодо *S. typhimurium* ATCC 29630 (Efm-3 – 17,2±0,7 мм та Efm-5 – 28,2±0,7 мм).

Результати досліджень з встановлення рівня антагоністичної активності штамів *Enterococcus faecium* стосовно взаємодії з грамнегативними і грампозитивними тестовими бактеріями показав незначну різницю між показниками за застосування різних методів досліджень – методу відтермінованого антагонізму і методу агарових блоків. За результатами досліджень рівня антагонізму дослідних штамів *Enterococcus faecium* методом агарових блоків було виявлено несуттєве зниження показників стосовно взаємодії з тестовими культурами, порівняно з показниками, одержаними за застосування методу відтермінованого антагонізму.

Аналіз результатів досліджень методом агарових блоків штамів Efm-3 та Efm-5 *Enterococcus faecium* підтвердив, що величини показників щодо антагоністичної дії на тестові культури *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 29630, *S. aureus* ATCC 6538 знаходився в межах значень, які були притаманні за результатами досліджень методом відтермінованого антагонізму (табл. 2).

Таблиця 2

Результати досліджень методом агарових блоків рівня антагоністичної активності ізолятів *Enterococcus faecium* за взаємодії з грамнегативними і грампозитивними тестовими бактеріями,  $M \pm m$ , мм,  $n=5$

№ з/п	Назва мікроорганізму	Назва штаму	Культури тестових мікроорганізмів							
			<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>S. typhimurium</i> ATCC 29630		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
			діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності
1.	<i>Enterococcus faecium</i>	Efm-1	25,0±0,3	С	23,6±0,3	С	12,2±0,7	Н	24,2±0,7	С
2.	– «» –	Efm-2	30,4±1,7	В	21,6±1,7	С	14,0±0,7	Н	20,8±0,7	С
3.	– «» –	Efm-3	36,4±0,3	Дв	28,4±0,7	В	17,2±1,7	С	28,4±0,7	В
4.	– «» –	Efm-4	25,0±0,3	С	21,6±1,7	С	13,8±0,7	Н	26,6±0,7	С
5.	– «» –	Efm-5	39,4±2,7	Дв	28,8±0,7	В	28,6±0,7	В	34,2±0,17	В

Примітки: рівні антагоністичної активності – «Н» – низький; «С» – середній; «В» – високий; «Дв» – дуже високий.

Вчені проявляють неабиякий інтерес до деяких видів ентерококів, зокрема *Enterococcus faecium*, щодо можливості їх застосування, як пробіотичних мікроорганізмів для конструювання пробіотиків, завдячуючи їх стійкості до несприятливих умов зовнішнього і внутрішнього середовищ. Але існує серйозне занепокоєння щодо використання бактерій роду *Enterococcus* у складі пробіотичних препаратів, оскільки вони швидко реагують на несприятливі фактори для їх життєдіяльності, відповідаючи генетичними змінами стійкості до того чи іншого подразника. Тому, дослідники наголошують на тому, що потрібно проводити поглиблені дослідження для відбору саме безпечних штамів ентерококів [12, 16–18].

Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезії робить їх привабливими у сенсі необхідних чинників, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції нормофлори шлунково-кишкового тракту, видів лакто- і біфідобактерій, зокрема [19–21].

Результати наших досліджень, проведених *in vitro* з встановлення рівня антагоністичної активності штамів *Enterococcus faecium*, підтвердили дуже високий, високий та середній антагонізм за величиною зон інгібування росту після взаємодії з грамнегативними і грампозитивними тестовими культурами що підтверджує їх пробіотичні спроможності.

## Висновок

Встановлено *in vitro* методами відтермінованого антагонізму та агарових блоків у 2 штамів *Enterococcus faecium* – Efm-3 і Efm-5 дуже високий та високий рівні антагоністичної активності після їхньої взаємодії з грамнегативними і грампозитивними тестовими бактеріями *E. coli* ATCC 25922 (діаметри зон інгібування росту 39,4±1,3/36,4±0,3 і 42,2±2,7/39,4±2,7 мм відповідно до штамів і методів), *P. aeruginosa* ATCC 15442 (29,0±1,3/28,4±0,7 і 29,2±1,3/39,4±2,7), *S. typhimurium* ATCC 29630

(17,2±0,7/17,2±1,7 і 28,2±0,7/28,6±0,7) і *S. aureus* ATCC 6538 (28,2±0,07/28,4±0,7 і 35,2±0,7/34,2±0,17). Штами Efm-3 і Efm-5 *Enterococcus faecium* відібрано в якості перспективних пробіотичних мікроорганізмів для конструювання біологічних препаратів.

Перспективи подальших досліджень будуть зосереджені на визначенні чутливості до антибіотиків пробіотичних штамів *Enterococcus faecium* через існуючу небезпеку щодо їхньої стійкості до антибіотичних препаратів, оскільки їм притаманна пряма передача набутих факторів антибіотико-резистентності мікробіоті навколишнього середовища, в т. ч. і шлунково-кишкового тракту птиці за умови використання таких штамів у складі пробіотиків.

## Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів щодо їхнього викладу та результатів досліджень.

## References

- Kurtiak, B. M., & Romanovych, M. M. (2015). Zastosuvannia probiotyktiv u ptakhivnytstvi – osnova epizootychnoho blahopoluchchia ptakho gospodarstv. *Naukovyi Visnyk Lvivskoho Natsionalnoho Universytetu Veterynarnoi Medytsyny ta Biotekhnologii im. S. Z. Gzhytskoho*, 17, 2 (62), 101–103. [in Ukrainian]
- Stoianovskiy, V. H., Kolomiets, I. A., Kolotnytskyi, V. A., & Kamratska, O. I. (2013). Mikroekolohichna systema kyshechnyku broileriv ta sposoby yii bionormalizatsii. *Naukovyi Visnyk Lvivskoho Natsionalnoho Universytetu Veterynarnoi Medytsyny ta Biotekhnologii im. S. Z. Gzhytskoho*, 15, 3 (57), 319–322. [in Ukrainian]
- Kalinichenko, S. V., Korotkykh, O. O., & Tishchenko, I. Yu. (2016). Suchasni napriamky stvorennia ta udoskonalennia probiotyktiv. *Ukrainskyi Biofarmatsevtichnyi Zhurnal*, 1 (42), 4–9. [in Ukrainian]
- Cash, B. D. (2014). Emerging Role of Probiotics and Antimicrobials in the Management of Irritable Bowel Syndrome. *Current Medical Research and Opinion*, 30 (7), 1405–1415. <https://doi.org/10.1185/03007995.2014.908278>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (1), 20–32.

6. Medvid, S. M., Hunchak, A. V., Stefanishyn, O. M., & Pashchenko A. H. (2017). Stan mikrobiotsenozu kurchatbroileriv za dii tsytrativ mikroelementiv. *Naukovi Visnyk Lvivskoho Natsionalnoho Universytetu Vetrynarnoi Medytsyny ta Biotehnologii im. S. Z. Ghzytskoho*, 19 (74), 224–228. [in Ukrainian]
7. Borshch, S. D. (2008). Dyferentsiiivane vykorystannia probiotykyv dlia antahonistychnoho vplyvu na hram pozytyvni bakterii u likuvanni kyshkovykh infektsii i syndromu bakteriozu kyshcheynyka. *Liky Ukrainy*, 6 (122), 69–74. [in Ukrainian]
8. Borshch, K. S., Vooitsekhivskiy, V. H., & Mishchuk, V. H. (2006). Mikrobiolohichne obruntuвання pokaziv do vykorystannia preparatu «Enterol-250» dlia eliminatsii zbudnykyv kyshkovykh infektsii i dysbakteriozu kyshcheynyka. *Arkhiv Klinichnoi Medytsyny*, 2, 20–24. [in Ukrainian]
9. Trykhliv, V. I. (2019). Enterokoky yak hlobalno vazhlyvi nozokomialni patoheny. Naukovo-praktychna konferentsiia z mizhnarodnoiu uchastiu «Aktualni infektsiini zakhvoriuvannia v praktytsi simeinoho likaria». *Novosti medytsyny y farmatsyy*, 7 (694), 1–4. [in Ukrainian]
10. Hadzevych, D. V., Dunaiev, Yu. K., & Hadzevych, O. V. (2014). Etiolohvchne znachennia enterokokiv ta yikh biolohichni vlastyvyosti u rozvytku infektsiinykh zakhvoriuvan velykoi rohatoi khudoby. *Vetrynarna Medytsyna*, 99, 79–83. [in Ukrainian]
11. Valyshev, A. V. (2012). Faktory patohennosti enterokokkov kyshcheynoi mykroflory cheloveka. *Zhurnal Mykrobiolohyy, Epydemiolohyy y Ymmunolohyy*, 4 (20), 41–43. [in Russian]
12. Ben Braiek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
13. Dehtiarenko, N. V., Shynkarenko, L. M., & Duhan, O. M. (2007). Kryterii vidboru probiotychnykh shtamiv mikroorhanizmiv. *Naukovi Zapysky, Biolohiia ta Ekolohiia*; 67, 30–36. [in Ukrainian]
14. Lutgendorff, F., Nijmeijer, R. M., Sandström, P. A., Trulsson, L. M., Magnusson, K. E., Timmerman, H. M., van Minnen, L. P., Rijkers, G. T., Gooszen, H. G., & Akkermans, L. M. (2009). Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS ONE*, 4:e4512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004512>
15. Ivchenko, V. M. (2004). *Dovidnyk sanitarno-mikrobiolohichnykh metodiv doslidzhennia kharchovykh produktiv ta obektiv dovkillia*. Bila Tserkva [in Ukrainian]
16. Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
17. Uda, A., Shigemura, K., Kitagawa, K., Osawa, K., Onuma, K., Yan, Y., Nishioka, T., Fujisawa, M., Yano, I., & Miyara, T. (2021). risk factors for the acquisition of *Enterococcus faecium* infection and mortality in patients with enterococcal bacteremia: A 5-Year retrospective analysis in a tertiary care university hospital. *Antibiotics*, 10 (1), 64. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010064>
18. Sattari-Maraji, A., Jabalameli, F., Node Farahani, N., Beigverdi, R., & Emaneini, M. (2019). Antimicrobial resistance pattern, virulence determinants and molecular analysis of *Enterococcus faecium* isolated from children infections in Iran. *BMC Microbiology*, 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1539-y>
19. Garkavenko, T. O., Gorbatyuk, O. I., Kozytyska, T. G., Andriyashchuk, V. O., & Dibkova, S. M. (2020). Determination of vancomycin-resistant strains (VRE) with VanA and VanB enzymes among field isolates of *Enterococcus* spp., obtained from drinking water samples. *Bulletin Veterinary Biotechnology*, 36, 21–33. [https://doi.org/10.31073/vet\\_biotech36-02](https://doi.org/10.31073/vet_biotech36-02)
20. Pidot, S. J., Gao, W., Buultjens, A. H., Monk, I. R., Guerillot, R., Carter, G. P., Lee, J. Y. H., Lam, M. M. C., Grayson, M. L., Ballard, S. A., Mahony, A. A., Grabsch, E. A., Kotsanas, D., Korman, T. M., Coombs, G. W., Robinson, J. O., Gonçalves da Silva, A., Seemann, T., Howden, B. P., Johnson, D. R., & Stinear, T. P. (2018). Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science Translational Medicine*, 10 (452). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar6115>
21. Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., & Raffatelli, M. (2013). Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3 (3), a010074–a010074. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010074>

#### ORCID

- O. Chechet  <https://orcid.org/0000-0001-5099-5577>
- V. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-2416-5219>
- O. Gorbatyuk  <https://orcid.org/0000-0002-0573-2089>
- O. Gaidei  <https://orcid.org/0000-0003-4503-4047>
- N. Kuryata  <https://orcid.org/0000-0002-6958-1064>
- I. Musiets  <https://orcid.org/0000-0002-2456-560X>
- D. Ordynska  <https://orcid.org/0000-0003-3481-3248>
- L. Shalimova  <https://orcid.org/0000-0003-1159-7159>
- G. Buchkovska  <https://orcid.org/0009-0007-4449-614X>



© 2023 Chechet O. et al. This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.