

УДК 579.22:579.253.4+277.18

В. А. ЩЕТКО, Н. А. ГОЛОВНЕВА

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail:shchatko@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 17.06.2013)

Введение. В настоящее время широкое развитие получила концепция бактериотерапии и бактериопрофилактики с помощью пробиотиков – препаратов живых микроорганизмов из числа основных представителей нормального кишечного биоценоза [1]. В составе пробиотических препаратов широко используются бифидо- и лактобактерии, преобладающие по численности и физиологической значимости в кишечнике человека и животных. Возможность быстрого восстановления нормофлоры с помощью бактерий рода *Bifidobacterium* обусловлена рядом физиолого-биохимических свойств, определяемых метаболической активностью пробиотических микроорганизмов, а также непосредственным антагонистическим воздействием бактерий и их метаболитов в желудочно-кишечном тракте на широкий спектр патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [2]. Однако их применение обычно проводится на фоне антибиотиков и других антибактериальных препаратов, что изменяет симбиотическое равновесие микрофлоры желудочно-кишечного тракта и вызывает возрастание резистентности условно-патогенных, патогенных микроорганизмов, развитие дисбактериоза.

Вопрос о влиянии антибактериальных препаратов на бифидобактерии как представителей нормальной микрофлоры до настоящего времени мало изучен, хотя является весьма важным в связи со значением этих микроорганизмов для организма хозяина. Кроме того, от устойчивости бактерий к антибиотикам широкого спектра действия, их способности колонизировать кишечник и действовать антагонистически по отношению к потенциальным патогенам зависит эффективность пробиотиков, содержащих клетки бифидобактерий [3, 4]. В литературе имеются отдельные сообщения о том, что входящие в состав биологических препаратов штаммы бактерий рода *Bifidobacterium* в большинстве своем чувствительны к антибиотикам и их количество при антибиотикотерапии быстро снижается [5, 6].

Цель данной работы – изучение антибиотикорезистентности 4 штаммов бифидобактерий к широко используемым в медицине и ветеринарной практике антибактериальным препаратам, а также получение штаммов бифидобактерий, обладающих высокой устойчивостью к антибиотикам различных классов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, *B. bifidum* 791, *B. longum* В379М, любезно предоставленные Московским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, а также штамм *B. adolescentis* 91-БИМ, полученный в лаборатории молочнокислых и бифидобактерий Института микробиологии НАН Беларуси.

Культивирование бактерий рода *Bifidobacterium* осуществляли при 37 °С на казеиново-лактозно-дрожжевой (КЛД) питательной среде, содержащей 0,1 % (жидкая), 0,2 % (полужидкая) агара. В качестве посевного материала использовали 18-часовые физиологически активные (инокулят III генерации) культуры, 5–10 об.% которых вносили в питательную среду в зависимости от целей эксперимента.

Для определения числа колониеобразующих единиц 1 мл исходной микробной взвеси вносили в пробирку с 9 мл полужидкой среды, тщательно перемешивали и готовили ряд последова-

тельных десятикратных разведений (до 10^{-10}), инкубировали в течение 2–3 сут. Количество колоний учитывали по двум последним разведениям, в которых наблюдался рост бифидобактерий, и выражали в КОЕ/мл среды.

Чувствительность бифидобактерий к антибиотикам различных классов (бензилпенициллину, бициллину-3, ампициллину, цефтазидиму, цефуроксиму, цефепиму, доксициклину, левомицетину, стрептомицину, амикацину, гентамицину, эритромицину) определяли методом серийных разведений в жидкой среде. Эксперименты проводили в 3–4-кратных повторностях.

Устойчивые к антибиотикам бактерии получали методом адаптивной селекции при культивировании на средах с добавлением повышающих концентраций соответствующего антибиотика [7]. Индуцированные мутанты бактерий, устойчивых к антибиотикам, получали после обработки культур мутагеном нитрозогуанидином и последующего высева клеток в среды с добавлением повышенных концентраций соответствующих антибиотиков [8].

Результаты и их обсуждение. Начальным этапом исследования явилось определение уровня чувствительности исходных штаммов бифидобактерий к антибиотикам.

В табл. 1 представлены результаты по определению антибиотикорезистентности штаммов бифидобактерий к антибиотикам различных классов. Видно, что антибиотики пенициллинового ряда гораздо эффективнее ингибируют рост бифидобактерий по сравнению с цефалоспоридами. В то время как бензилпенициллин и бициллин-3 ингибируют рост *B. adolescentis* МС-42 и *B. adolescentis* 91-БИМ уже при концентрации 0,4 мкг/мл, а *B. bifidum* 791 и *B. longum* В379М – при 0,2 мкг/мл, цефалоспорины оказывают ингибирующее действие в концентрациях 1–4 мкг/мл. Наибольшую устойчивость исходные штаммы бифидобактерии проявили к цефалоспорины III поколения – цефтазидиму. Отмечены некоторые штаммовые отличия в устойчивости бифидобактерий к действию антибиотиков. Так, штаммы *B. adolescentis* МС-42 и *B. adolescentis* 91-БИМ обладают одинаковой чувствительностью к β -лактамам антибиотикам. *B. bifidum* 791, *B. longum* В379М менее устойчивы к действию бензилпенициллина и бициллина – минимальная ингибирующая концентрация 0,2 мкг/мл, но штамм *B. longum* В379М несколько более устойчив к цефуроксиму – минимальная ингибирующая концентрация составила 2 мкг/мл.

Т а б л и ц а 1. Чувствительность бифидобактерий к антибиотикам различных классов

Антибиотик	Минимальные ингибирующие концентрации, мкг/мл			
	<i>B. adolescentis</i> МС-42	<i>B. adolescentis</i> 91БИМ	<i>B. longum</i> В379М	<i>B. bifidum</i> 791
Бензилпенициллин	0,4	0,4	0,2	0,2
Бициллин-3	0,4	0,4	0,2	0,2
Ампициллин	0,6	0,7	1	0,5
Биотум (цефтазидим)	4	4	4	4
Биофуроксим (цефуроксим)	1	1	2	0,8
Максипим (цефепим)	4	4	4	4
Стрептомицин	2000	2000	80	400
Амикацин	2000	2000	2000	2000
Гентамицин	2000	2000	800	1000
Доксициклин	2	2	2	2
Левомецетин (хлорамфеникол)	50	50	40	40
Эритромицин	0,4	0,4	0,2	0,2

Исследуемые штаммы устойчивы к высоким концентрациям аминогликозидов I–III поколений: стрептомицину, гентамицину, амикацину. Ингибирующая концентрация гентамицина варьирует от 800 мкг/мл для *B. longum* В379М до 2000 мкг/мл для *B. adolescentis* МС-42 и *B. adolescentis* 91-БИМ. Все исследуемые штаммы одинаково устойчивы к амикацину в концентрации 2000 мкг/мл. По отношению к стрептомицину также наблюдается штаммоспецифическая устойчивость. *B. adolescentis* МС-42, *B. adolescentis* 91-БИМ устойчивы к данному антибиотику в концентрации 2000 мкг/мл. *B. bifidum* 791, *B. longum* В379М более чувствительны к стрептомицину, их рост ингибируется при концентрации 400 и 80 мкг/мл соответственно.

По отношению к антибиотикам других классов – доксициклину, левомицетину, эритромицину – исследуемые штаммы обладают меньшей устойчивостью. Ингибирующие концентрации составляют от 0,2 мкг/мл для эритромицина до 50 мкг/мл для левомицетина соответственно.

Таким образом, определена чувствительность штаммов *B. adolescentis* МС-42, *B. adolescentis* 91-БИМ, *B. longum* В379М, *B. bifidum* 791 к антимикробным агентам с различным механизмом действия. Показано, что исходные штаммы бактерий наиболее чувствительны к β -лактамным антибиотикам. Эритромицин и антибиотики тетрациклинового ряда также эффективно угнетают рост бифидобактерий. Наибольшую устойчивость указанные штаммы проявили к аминогликозидам. Значительных различий в чувствительности к антибиотикам у исследуемых штаммов не выявлено, однако *B. adolescentis* МС-42 и *B. adolescentis* 91-БИМ характеризуются более высокой природной устойчивостью к пенициллиновым антибиотикам, аминогликозидам, левомицетину, эритромицину по сравнению со штаммами *B. bifidum* 791 и *B. longum* В379М.

Известно, что в ветеринарной и медицинской практике для повышения терапевтического эффекта используется синергизм между β -лактамными антибиотиками и аминогликозидами, взаимодополняющее действие которых основано на повышении проницаемости клеточной стенки [9]. При одновременном действии на микроорганизмы аминогликозидного и β -лактамного антибиотиков повреждается клеточная стенка и обеспечивается доступ аминогликозида в клетку [10]. Для получения мутантов бифидобактерий с одиночной и множественной устойчивостью к повышенным концентрациям антибиотиков были отобраны антимикробные агенты пенициллинового ряда, цефалоспорины, аминогликозид гентамицин, а также эритромицин.

Методом адаптивной селекции у всех исследуемых штаммов бифидобактерий были получены варианты, устойчивые к эритромицину в концентрации 0,5 мкг/мл. Получены также варианты *B. adolescentis* МС-42, *B. adolescentis* 91-БИМ, устойчивые к повышающим концентрациям гентамицина – до 4000 мкг/мл и цефуроксиму – 4 мкг/мл, что превышало исходный уровень в 2–4 раза соответственно. Также были получены варианты *B. longum* В379М и *B. bifidum* 791, устойчивые к гентамицину в концентрации 2000 мкг/мл. Однако после 5–10 пассажей в жидкой среде с исходной концентрацией антибиотика полученные варианты бактерий утрачивали признак устойчивости к антибиотикам. Тем не менее методом адаптивной селекции удалось выделить штаммы *B. adolescentis* МС-42, *B. adolescentis* 91-БИМ и *B. bifidum* 791, устойчивые к цефуроксиму в концентрации 2 мкг/мл, а *B. longum* В379М – 4 мкг/мл, сохраняющие жизнеспособность и признак устойчивости к этому антибиотику при хранении в течение 6 мес (30 пассажей).

С учетом того что индуцированный мутагенез широко используется в современных исследованиях и позволяет получать мутанты с длительным сохранением определенного признака, была проведена работа в этом направлении.

В результате индуцированного мутагенеза с использованием нитрозогуанидина были получены жизнеспособные варианты *B. adolescentis* МС-42, устойчивые к трем антибиотикам, и *B. adolescentis* 91 БИМ, устойчивые к пяти антибиотикам (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Устойчивость к антибиотикам штаммов бифидобактерий, полученных путем индуцированного мутагенеза

Антибиотик	Концентрация, мкг/мл
<i>B. adolescentis</i> 91 БИМ	
Бензилпенициллин	10,0
Ампициллин	10,0
Цефтазидим	10,0
Цефуроксим	20,0
Цефепим	10,0
<i>B. adolescentis</i> МС-42	
Бензилпенициллин	5,0
Доксициклин	5,0
Цефепим	10,0

Варианты бактерий с повышенной устойчивостью к антибиотикам при пересеве на среды с данными концентрациями антибиотиков сохраняли жизнеспособность (10^7 – 10^8 КОЕ/мл) в течение, по крайней мере, двух лет хранения, что свидетельствует о стабильности полученного признака устойчивости к антибиотикам. В результате мутации повышена устойчивость *B. adolescentis* MC-42 и *B. adolescentis* 91-БИМ к пенициллиновым антибиотикам в 12–25, к цефалоспорином – в 2–10 раз.

Заключение. Показано, что резистентность к антибиотикам у бифидобактерий возникает в результате как спонтанного, так и индуцированного мутагенеза. В результате проведенной работы изолированы мутанты, обладающие повышенной моно- и полирезистентностью к пенициллиновым антибиотикам, цефалоспорином, а также доксициклину.

Литература

1. Servin A. L. // FEMS Microbiol. Rev. 2004. Vol. 28. P. 405–440.
2. De Roos N. M., Katan M. B. // Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71. P. 405–411.
3. Konieczna P., Akdis C. A., Quigley E. M. et al // Gut Microbes. 2012. Vol. 3, №3. P. 261–266.
4. Пукина А. П., Смянов В. В., Ефимов Б. А., Байнов Н. А. // Журн. микробиол. 1999. № 6. С. 34–38.
5. Mariet J., Van der Werf, Venema K. // J. Agric. Food Chem. 2001. Vol. 49. P. 378–383.
6. Masco L., Van Hoorde K., De Brandt E. et al // J. Antimicrob. Chemother. 2006. Vol. 58, № 1. P. 85–94.
7. Lim K. S., Huh C. S., Baek Y. J. // J. Dairy Sci. 1993. Vol. 76, № 8. P. 2168–2174.
8. Ibrahim S. A., O'Sullivan D. J. // J. Dairy Sci. 2000. Vol. 83, № 5. P. 923–930.
9. Ammor M. S., Flórez A. B., Mayo B. // Food Microbiol. 2007. Vol. 24. P. 559–570.
10. Сидоренко С. В., Тушков В. И. // Успехи биол. химии, 2004. Т. 44. С. 263–306.

V. A. SHCHATKO, N. A. GOLOVNYOVA

SENSITIVITY OF BIFIDOBACTERIAL SPESIES TO DIFFERENT TYPES OF ANTIBIOTICS

Summary

Susceptibility of bifidobacteria (*B. adolescentis* MC-42, *B. bifidum* 791, *B. longum* B379M и *B. adolescentis* 91-БИМ), to antibiotics differing in mechanism of action was defined and proved to be the highest with respect to β -lactam drugs and the least – to aminoglycoside group. Induced procedure of mutagenesis resulted in stable strains of bifidobacteria showing 12–25-fold increase in resistance to antibiotics of penicillin series and 2–10 times enhanced tolerance to cephalosporins as compared to wild-type cultures