

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ АНТИБИОТИКОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ И ИХ АССОЦИАТИВНУЮ КУЛЬТУРУ

А. А. Бибарсова, Е. Ф. Семенова, Е. В. Жученко

Пензенский государственный университет

Поступила в редакцию 14.01.2015 г.

Аннотация. В представленной работе обсуждаются результаты исследования резистентности коллекционных штаммов *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* и их ассоциативной культуры к антимикробным препаратам различных классов. Проведенный мониторинг антибиотикорезистентности молочнокислых бактерий свидетельствует об уровне чувствительности исследуемых штаммов к современным антибиотикам, что позволяет обосновать создание на их основе пробиотических препаратов.

Ключевые слова: штаммы молочнокислых бактерий, антибактериальные препараты, чувствительность к антибиотикам.

Abstract. In the presented work the results of the study of resistance collective strains *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* and their associative culture to antimicrobial agents of different classes are discussed. The monitoring of antibiotic resistance of lactic acid bacteria made it possible to get the data about the level of sensitivity of the studied strains to modern antibiotics, which allows to justify the creation on their basis of probiotic medicines.

Key words: strains of lactic acid bacteria, antibacterial drugs, sensitivity to antibiotics.

Химиотерапевтические препараты, в том числе и антибиотики, являются основными средствами борьбы с инфекционными заболеваниями бактериальной природы [1]. Однако обилие указанных препаратов часто сопровождается их бессистемным использованием [2, 3], что снижает эффективность применения антибиотиков и увеличивает частоту развития дисбиозов и диарей. В настоящее время при нарушении микробиоценоза кишечника используют современные принципы лечебной коррекции дисбиотических сдвигов, включающие патогенетическое лечение основного заболевания, восстановление нормальной микрофлоры с использованием различных средств коррекции [4].

Преимуществом применения пробиотиков является наличие антибиотикорезистентности входящих в их состав молочнокислых штаммов и возможность совместного применения с антибиотиками. В этой связи информация об антибиоти-

кочувствительности пробиотических микроорганизмов имеет немаловажное значение для врача, который выписывает данную группу. Таким образом, цель настоящего исследования – оценка устойчивости коллекционных штаммов пробиотических микроорганизмов и их ассоциативной культуры к наиболее распространенным современным антибиотическим препаратам, используемым для профилактики и лечения бактериальных инфекций.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами изучения служили 3 коллекционных штамма молочнокислых бактерий: *Lactobacillus acidophilus* RCAM 01850 [5], *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* RCAM 02909, *Streptococcus thermophilus* RCAM 02910 и созданный на их основе бактериальный консорциум. Все штаммы депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) ГНУ ВНИИСХМ.

Выращивание и идентификацию штаммов осуществляли традиционными методами с последующим определением культурально-морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств [6-7].

Выявление резистентности *L. acidophilus* к антибиотикам проводилось на агаре MRS; *L. lactis* ssp. *lactis* - на стрептококковом агаре. Для *S. thermophilus* и консорциума использовали несколько сред: стрептококковый агар, MRS-агар, АГВ, лактоагар. Чувствительность пробиотических штаммов к антибиотикам изучали диско-диффузным методом (ДДМ) [8] при использовании стандартных дисков, пропитанных основными классами антибактериальных препаратов (табл.1).

Таблица 1

Перечень использованных антибактериальных препаратов

Класс	Международное название	Условное обозначение	Концентрация, мкг (*ЕД)
Пенициллины	Амоксициллин	Амох	20
	Бензилпенициллин	Врс	10 *
Цефалоспорины	Цефазолин	Cefaz	30
	Цефтазидин	Ceftaz	30
	Цефтриаксон	Ceftr	30
	Цефотаксим	Cef	30
	Цефепим	Cefp	30
Хинолоны	Ципрофлоксацин	Cfc	5
Аминогликозиды	Стрептомицин	Stc	300
	Гентамицин	Gm	120
Тетрациклины	Тетрациклин	Tetc	30
Полимиксины	Полимиксин	Pol	300*
Оксазолидиноны	Линезолид	Lz	30
Макролиды	Кларитромицин	Cmyc	15
Гликопептиды	Ванкомицин	Van	30
Другие антибиотки	Фузидин-натрия	Fuz	10

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ чувствительности штамма *L. acidophilus* RCAM 01850 к действию антибиотиков показал наличие бактерицидного эффекта в 6 случаях из 16 (37.5%), бактериостатического эффекта в 7 случаях из 16 (43.75%) и проявление сочетанного эффекта в 4 из 16 определений (25%). Статистические показатели активности антибиотических субстанций в отношении штамма представлены в таблице 2.

Полученный высокий коэффициент вариации (больше 33%) для антибиотиков Amox, Van, Врс, Fuz, Gm, Stc, Tetc свидетельствует о необходи-

мости дальнейшей экспериментальной проверки выраженности их действия. Незначительную изменчивость вариационного ряда зон продемонстрировали Lz, Cef, Cmyc. Для полимиксина коэффициент вариации составил 14 %, что указывает на среднюю вариабельность изучаемого показателя. Высокую чувствительность штамм RCAM 01850 проявил в отношении Lz, Van, Cefaz, Ceftaz, Ceftr, Cefp. От средней до высокой выраженности антибиотического действия в отношении штамма RCAM 01850 наблюдали у ванкомицина.

Таблица 2.

Результаты определения чувствительности *L. acidophilus* RCAM 01850 к антибиотикам на MRS-агаре

Антибиотик	Зона отсутствия, задержки роста*		
	Lim, мм	CV, %	$\bar{x} \pm S_x$, мм
Lz	27...30	5.0	28.3+1.3
Pol	6...8	14.3	7.0+ 1.0
Amox	6...31	40.9	23.2+ 9.5
Cfc	15...18*	7.9	16.3+1.3
Van	22...26	68.4	43.7+29.9
Cmyc	6...30*	52.8	18.0+9.5
Врс	15...45	46.0	27.8+12.8
Fuz	6...16*	45.5	11.0+5.0
Gm	6...19*	40.6	13.3+5.4
Stc	6...21*	55.6	13.5+7.5
Cef	15...17*	5.0	16.0+0.8
Cefaz	25...28	5.7	26.5+1.5
Tetc	6...16*	36.5	12.3+4.5
Ceftaz	6...30	37.8	22.2+8.4
Ceftr	27...30	4.6	28.3+1.3
Cefp	6...40	40.6	30.8+12.5

Полученные результаты действия антибиотиков на *L. lactis* показали бактерицидный эффект в 6 случаях из 16 (37.5%), бактериостатический - в 8 случаях из 16 (50.0%), отсутствие эффекта в 2 из 16 определений (12.5%) (табл.3).

Таблица 3.

Результаты определения чувствительности *L. lactis* ssp. *lactis* RCAM 02909 к антибиотикам на стрептококковом агаре

Антибиотик	Зона отсутствия, задержки роста*		
	Lim, мм	CV, %	$\bar{x} \pm S_x$, мм
Lz	17...35	22.1	26.3+5.8
Tetc	10...14	12.2	12.3+1.5
Gm	10	0.0	10.0+0.0
Fuz	14...21*	15.0	18.0+2.7
Va	19...26	17.4	22.4+3.9
Pol	13...20*	17.4	15.5+2.7
Врс	30...37	7.6	33.0+2.5
Cfc	13...17*	9.3	15.0+1.4
Stc	13...15*	5.7	14.0+0.8
Cmyc	21...27	9.5	24.2+2.3
Amox	25...30	9.1	27.5+2.5
Cef	15...17*	5.0	16.0+0.8
Cefaz	9...11	8.0	10.0+0.8
Ceftaz	10...15*	18.3	12.0+2.2
Ceftr	13...15*	7.1	14.0+1.0
Cefp	20*	0.0	20.0+0.0

Незначительная изменчивость вариационного ряда (меньше 10%) наблюдается у антибиотиков Cef, Ceftr, Cmuc, Cefaz, Amox, Stc, Cfc, Bpc, составляющих (в сумме) 50% от числа испытываемых. У 25 % антибиотиков (Lz, Van, Pol, Ceftaz) коэффициент вариации больше 10%. К Van, Bpc, Cmuc, Amox *L. lactis* проявил высокую чувствительность. Следует отметить, что экспериментальные данные в отношении Fuz, Tetc, Cefp, Gm имели значения с незначительным или умеренным варьированием.

В результате действия антибиотиков на *S. thermophilus* при использовании агара MRS, АГВ, стрептококкового агара были получены следующие данные: бактерицидный эффект в 4 случаях из 16 (25.0%), в 7 случаях из 16 бактериостатический эффект (43.75%), отсутствие эффекта в 3 из 16 исследований (18.75%), проявление бактериостатического и бактерицидного эффекта в 2 из 16 исследований (12.5%) (табл.4).

Полученные данные на среде MRS для некоторых антибиотиков (Fuz, Amox, Stc, Cefaz, Tetc, Gm) свидетельствуют о необходимости дополнительных исследований. Незначительную изменчивость вариационного ряда значений показали Van, Bpc, Cfc, Cmuc, Ceftaz, Ceftr. Средняя изменчивость зон наблюдалась у Lz, Cef, Cefp. Высокую чувствительность штамм проявил к Lz, Van, Cef, Gm, Cfc, Cefaz, Ceftaz.

S. thermophilus оказался малочувствителен к Bpc, Cefp, Tetc. Большим коэффициентом вариации характеризовались Lz, Pol, Van, Fuz, Amox,

Stc, Tetc, Ceftr, Ceftaz на среде АГВ. Для Gm выявлена незначительная изменчивость чувствительности исследуемого штамма. Bpc, Cfc, Cefp показали среднюю изменчивость показателя. Высокую чувствительность штамм проявил к антибиотикам Amox, Cefaz. Антибиотики Cef, Ceftaz, Cefp, Tetc не оказали влияние на исследуемый штамм.

На стрептококковом агаре *S. thermophilus* оказался высокочувствительным к антибиотикам Bpc, Cef, Gm, Cefaz, Cefp. Отсутствие антибактериального эффекта наблюдалось у линезолида. К Pol, Van, Ceftr штамм показал среднюю чувствительность. К Amox, Stc, Cfc, Cmuc, Tetc штамм RCAM 02910 оказался малочувствителен.

При исследовании действия антибиотиков на ассоциативную культуру были получены следующие данные: бактерицидный эффект - в 2 случаях из 16 (12.5%), бактериостатический - в 7 случаях из 16 (43.75%), отсутствие эффекта в 4 из 16 определений (25.0%), совместное проявление бактериостатического и бактерицидного эффекта в 1 из 16 определений (6.25%) (табл. 5).

На лакто-агаре зоны ингибирования роста культуры Cefaz, Ceftaz, Cmuc, Ceftr, Bpc, Stc имели неровные размытые края, что доказывает высокую вариабельность полученных значений и, возможно, требует дополнительного проведения большего числа исследований. Для 43 % антибиотиков: (Amox, Cef, Van, Cefp, Tetc, Gm, Lz) на лакто-агаре и для (Cef, Cefaz, Cefp, Tetc, Cfc) на агаризованном обезжиренном молоке значение

Таблица 4.

Результаты определения чувствительности *S. thermophilus* RCAM 02910 к антибиотикам на различных средах

Анти-биотик	Зона отсутствия, задержки роста*								
	Lim, мм			CV, %			$\bar{x} \pm S_x$, мм		
	MRS	АГВ	СК	MRS	АГВ	СК	MRS	АГВ	СК
Lz	27...40	6...30		15.3	80.5		32.0+4.9	19.5+15.7	
Pol	6	6...20	14...20*	0.0	53.8	16.0	6,0+0,0	13,0+7,0	16,3+2,6
Va	22...27	6...30	19...26	8.6	36.7	11.7	24.5+2.1	21.8+8.0	23.0+2.7
Bpc	13...15*	6...32	30...37	5.7	21.3	8.8	14.0+0.8	26.0+7.1	33.0+2.9
Fuz	6...30	6...21	20...30	43.2	55.6	16.7	19.2+8.3	13.5+7.5	24.0+4.0
Cef	28...40	6	30...37	15.1	0.0	7.6	31.8+4.8	6.0+0.0	33.0+2.5
Amox	6...30	6...28	14...15*	51.2	41.9	3.4	21.3+10.9	21.0+8.8	14.5+0.5
Stc	6...27*	6...27	13...15*	41.4	45.3	7.1	19.8+8.2	17.2+7.8	14.0+1.0
Cfc	25...28	20...25	14...15*	5.7	11.1	3.4	26.5+1.5	22.5+2.5	14.5+0.5
Cmuc	16...17*	20	10...15*	3.03	0.0	18.3	16.5+0.5	20.0+0.0	12.0+2.2
Gm	14...30*	21...25	25	29.1	7.5	0.0	23.0+6.7	22.7+1.7	25.0+0.0
Cefaz	6...40	30	30	38.2	0.0	0.0	29.6+11.3	30.0+0.0	30.0+0.0
Ceftaz	35...40	6...25	10...35	6.7	61.3	37.6	37.5+2.5	15.5+9.5	23.4+8.8
Ceftr	15...18*	6...22	10...17	8.0	32.3	20.3	16.3+1.3	16.7+5.4	13.8+2.8
Cefp	10...17*	6...10	19...26	20.7	20.5	17.4	14.0+2.9	8.3+1.7	22.4+3.9
Tetc	6...15*	6...12		34.4	33.3	4.3	11.7+4.0	9.0+3.0	11.5+0.5

Примечания. MRS - мясо пептонный агар, АГВ - агар Гивенталья-Ведьминой, СК-стрептококковой агар.

коэффициента вариации больше 10%. На лакто-агаре при действии Amox, Ceftaz, Cefp, Lz, Cefaz, Ceftr консорциум проявил высокую чувствительность. К Fuz, Gm, Tetc, Stc бактерии малочувствительны. На агаризованном обезжиренном молоке в отношении Cef, Cefaz, Ceftaz, Cmyc, Cefp, Lz ассоциация проявила высокую чувствительность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование свидетельствует, что исследуемые штаммы пробиотических микроорганизмов чувствительны в опытах *in vitro* к представителям основных классов антимикробных препаратов. Полученные данные о бактерицидном действии антибиотиков на ассоциативную культуру с частотой 12.5 % и о бактериостатическом эффекте в 50.0 % случаев дают основание утверждать, что именно консорциум обладает определенной устойчивостью к антибактериальным препаратам, что позволяет совместное использование его с антибиотиками.

По результатам проведенного анализа бактериостатическое действие на *L.acidophilus* RCAM01850 оказали антибиотики цефалоспоринового ряда (Ceftaz, Ceftr, Cef) в концентрациях 30 мкг и аминогликозиды (Stc, Gm) в концентрациях 300 и 120 мкг, соответственно. Антибиотики класса хинолинов (Cfc) и тетрациклинов (Tetc)

продемонстрировали бактериостатическое действие только в двух случаях. Все антибиотики пенициллинового ряда оказывали на штамм бактерицидное действие. Ванкомицин в концентрации 30 мкг, кларитромицин 15 мкг действовали бактериостатически как на *L.acidophilus*, так и на *S.thermophilus*. Цефалоспорины подавляли рост культур термофильного стрептококка и молочной закваски. Следует отметить отсутствие роста бактериального консорциума и ацидофильной палочки под воздействием линезолида в концентрации 30 мкг. Амоксициллин 20 мкг, гентамицин 120 мкг, тетрациклин 30 мкг, ванкомицин 30 мкг угнетали рост бактерий молочнокислой закваски. Причем концентрация этих антибиотиков превышала их максимально допустимую концентрацию в крови: для амоксициллина - 7-8 мкг·мл⁻¹, гентамицина - 8-10 мкг·мл⁻¹, тетрациклина - 4 мкг·мл⁻¹, что естественно показывает целесообразность применения консорциума при антибиотикотерапии указанными препаратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Современное состояние и перспективы решения проблемы повышения эффективности экстренной профилактики и лечения системных бактериальных инфекций / Т.А. Бондарева [и др.] // Молекулярная медицина. — 2009. — №5. — С.21-25.

Таблица 5.

Результаты определения чувствительности молочнокислой закваски к антибиотикам

Антибиотик	Зона отсутствия, задержки роста*					
	Lim, мм		CV, %		$\bar{x} \pm S_x$, мм	
	Лас-агар	Агаризованное обезжиренное молоко	Лас-агар	Агаризованное обезжиренное молоко	Лас-агар	Агаризованное обезжиренное молоко
Amox	20...30	нд	14.4	нд	26.3±3.8	нд
Cef	14...30	20...30	30.8	16.5	21.4±6.6	26.0±4.3
Cefaz	6...40	29...40	45.6	15.1	25.0±11.4	33.0±4.97
Ceftaz	6...37	6...40	60.4	46.4	22.5±3.6	29.5±13.7
Van	14...27	нд	27	нд	20.0±5.4	нд
Cmyc	13...30	25...27	30.9	3.8	22.0±6.8	26.0±1.0
Ceftr	15...40	нд	47.3	нд	22.0±10.4	нд
Fuz	15*	15*	0.0	0.0	15.0±0.0	15.0±0.0
Cefp	19...32	19...30	20.8	17.7	26.0±5.4	24.8±4.4
Tetc	10...15*	10...15*	29.7	14.6	12.8±3.8	13.0±1.9
Gm	10...15*	нд	14.6	нд	13.0±1.9	нд
Lz	25...40	35...40	18.6	6.7	33.3±6.2	37.5±2.5
Bpc	15...40	нд	45.5	нд	27.5±12.5	нд
Pol	6	нд	0.0	нд	6.0± 0.0	нд
Stc	10...20*	нд	33.3	нд	15.0±5.0	нд
Cfc	нд	10...14*	нд	14.6	нд	13.0±1.9

Примечание. Нд- нет данных.

2. Антибиотикопрофилактика, антибиотикотерапия и микробиологическая ситуация в хирургическом стационаре / В.Н. Оболенский [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — Т. 49, № 10. — С. 13-19.

3. Бельмер С.В. Дисбактериоз кишечника как осложнение анти-бактериальной терапии / С.В. Бельмер // Детские инфекции. — 2007. — Т. 6, № 2. — С. 44-48.

4. Мишушкин О.Н., Ардатская М.Д., Зверков И.В., Чичерин И.Ю. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пребиотической терапии: учебно-методическое пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей. — М.: Учебно-методический центр управления делами Президента Российской Федерации, 2010. — 50 с.

5. Патент № 2524117. Штамм бактерии *Lactobacillus acidophilus* РСАМ 01850, используемый для приготовления кисломолочного про-

дукта / Бибарсова А.А., Семенова Е.Ф., Степанова А.П., Ловцова Л.Б., Моисеева И.Я. (РФ) // Открытия. Изобретения, 2014. — Бюл. № 21. — 5 с.

6. Bibarsova A.A. Cultural-morphological, physiological and biochemical analysis of cultures collection of lactic acid cocci / A.A. Bibarsova, E.F. Semenova, I.Y. Moiseeva // Материалы Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны», Пенза, 15-16 сентября 2011. — Ч.1 — С. 138 – 140.

7. Бибарсова А.А. Анализ коллекционных культур лактобацилл / А.А. Бибарсова, Е.Ф. Семенова, И.Я. Моисеева // Сборник трудов Международной научной Интернет-конференции: «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы». — Казань: Альянс, 2012. — С. 27-30.

8. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / под ред. проф. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 312–345.

Бибарсова Альфия Алиевна — соискатель кафедры «Общая и клиническая фармакология» медицинского института ФГБОУ ВПО «Пензенского государственного университета»; e-mail: alfiya.bibarsova@mail.ru

Семенова Елена Федоровна — к.б.н., с.н.с., профессор кафедры «Общая и клиническая фармакология» медицинского института ФГБОУ ВПО «Пензенского государственного университета»; e-mail: sef1957@mail.ru

Жученко Елена Владимировна — студентка специальности «Фармация», Пензенский государственный университет; e-mail: lenochek_zhuchenko@mail.ru

Bibarsova Alfiya A. — Applicant sub-department of General and Clinical Pharmacology, Penza State University; e-mail: alfiya.bibarsova@mail.ru

Semenova Elena F. — PhD (Biology), staff scientist, professor sub-department of general and clinical pharmacology, Penza State University; e-mail: sef1957@mail.ru

Zhuchenko Elena V. - student, Penza State University; e-mail: lenochek_zhuchenko@mail.ru