

УДК 637.135.3/5, 579.62

С.О. Гарда, С.Г. Даниленко, Г.С. Литвинов

**ВИЗНАЧЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ**

The objective of research is to determine sensitivity of a probiotic strain to a number of antibiotics which are frequently used in the veterinary practice. To that end, we employ disk-diffusion method in the MRS-agar and used standard antibiotics-soaked paper discs. The results interpretation conform to literary sources. Specifically, *Lactobacillus rhamnosus*; *L.acidophilus*; *L.brevis*; *L.paracasei* ssp. *paracasei*; *L.casei*; *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *L.helveticus*; *Bifidobacterium gallinarum*; *B.bifidum*; *B.longum*; *B.infantis*; *B.adolescentis* are extracted from various natural sources and identify to that stem. Relying on morphological, cultural and physical-biochemical properties, we determined species belongings of the isolated strains. Analyzing the obtained data, we can conclude that cultures *L.rhamnosus*, *L.acidophilus*, *L.brevis* and *B.gallinarum*, *B.bifidum* are the most stable to main groups of antibiotics and that's why they are prospective for using as a complex probiotic preparation in biotechnology.

**Вступ**

На сьогодні гостро стоїть проблема лікування і профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту. У промисловому птахівництві, за даними різних джерел, втрати від бактерійних хвороб становлять більше 70 %. За хронічних, уповільнених хвороб бактерійної етіології відзначають нерівномірний або низький приріст маси бройлерів, підвищену чутливість до стресів, погіршення яйценосності та виведення курчат, біологічних якостей ембріонів, протівірусного імунітету, погану конверсію корму. Швидке збільшення м'язової маси бройлерів і непропорційне відставання маси внутрішніх органів веде до ослаблення імунітету. На цьому фоні виникають передумови для активізації умовно-патогенної мікрофлори. Найбільш чутливі до зараження патогенною і умовно-патогенною мікрофлорою курчата раннього віку.

Відомо, що будь-яка патологія у птиці супроводжується порушенням мікрофлори кишківника, що веде до виникнення дисбактеріозів. Широке застосування антибіотиків для лікування багатьох захворювань інфекційної природи призводить до виникнення серед мікробів стійких до антибіотиків форм [1–3].

У 50-х рр. ХХ ст. використання в кормах сільськогосподарської птиці антибіотиків-стимуляторів росту привело до різкого збільшення продукції птахівництва за рахунок зниження захворюваності і поліпшення показників. Для людей антибіотики використовують у разі крайньої необхідності, для птиці їх іноді застосовують постійно. Вони застосовуються для прискорення росту, а також для контролю над захворюваннями, що виникають в умовах промислового птахівництва, де птицю утримують у

переповнених приміщеннях, а іноді і в антисанітарних умовах. Інтенсивна антибіотикотерапія призвела до виведення штамів мікроорганізмів, резистентних практично до всіх наявних антибіотиків. У результаті створюються нові, ефективніші препарати, а за ними з'являються все більш стійкі бактерії. Наприклад, за рахунок введення жорсткого контролю використання антибіотиків – в першу чергу, в тваринницькій і птахівницькій галузях. Тому надмірне використання антибіотиків у птахівництві є однією з причин, чому часто основні препарати вже є неефективними або малоефективними при лікуванні захворювань у людей. У 1997, 1998, 2003 рр. ЄС прийняв розпорядження, які забороняли використовувати антибіотики-стимулятори росту для годування тварин і птиці. Вживання цих препаратів мало припинитися, починаючи з січня 2006 р. [4].

Однією з реальних альтернатив для підвищення продуктивності птиці є пробіотики, препарати, які містять живі культури мікроорганізмів-симбіонтів шлунково-кишкового тракту [5, 6].

Застосування пробіотиків у господарствах і птахофабриках дає можливість:

- істотно підвищити природну резистентність організму, зберегти на високому рівні імунний статус і знизити ризик виникнення інфекційних захворювань тварин та птиці;
- забезпечити профілактику, ліквідувати або звести до мінімуму такі хронічні захворювання, як мікоплазмоз, колібактеріоз, сальмонельоз, стрепто- і стафілококоз;
- підвищити ефективність вакцинацій, за даними науки, в два–три рази.

Для виготовлення пробіотиків на основі живих мікроорганізмів нині використовуються

представники різних видів (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*, *Enterococcus faecalis*, *E.faecium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L.felventicus*, *L.fermentum*, *L.lactic*, *L.rhamnosus*, *L.salivarius*, *L.planatarum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* та ін.). Проводиться направлений відбір штамів мікроорганізмів, які мають володіти адгезивною здатністю та антагоністичною активністю до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, стійкістю до антибіотиків та не повинні пригнічувати представників нормофлори, а також мають продукувати корисні для тварин біологічно активні речовини [7, 8].

Актуальність дослідження перспективних пробіотичних штамів щодо стійкості до антибіотиків дає можливість включення кращих з них до складу пробіотичного препарату для сільськогосподарських птахів.

### Постановка задачі

Проблема профілактики та лікування шлунково-кишкових патологій у тварин, збудниками яких є умовно-патогенні кишкові мікроорганізми, має не тільки економічне, а й соціальне значення. Зниження колонізаційної резистентності кишечника призводить до проникнення мікроорганізмів в органи і тканини тварин. Свідченням реального існування такої загрози є дані Всесвітньої організації охорони здоров'я, за якими почастишали спалахи харчових інфекцій у населення в країнах з традиційно високим споживанням яєць, м'яса або зі звичаями споживати напівсирі м'ясні продукти. Причину захворювань пов'язують з патогенними мікроорганізмами, що потрапили до людини з продуктами тваринництва.

Метою нашої роботи стало з'ясування чутливості до ряду антибіотиків культур мікроорганізмів різних таксономічних груп.

Завдання: провести визначення чутливості до основних груп антибіотиків, які найчастіше використовуються у ветеринарній практиці.

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили у відділі біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН.

Для перспективних штамів біфідобактерій (5) та лактобацил (7) визначали чутливість до

антибіотиків диско-дифузійним методом у MRS-агарі з використанням стандартних паперових дисків, які просочені антибіотиками [9]. Інтерпретацію результатів тестування проведено відповідно до літературних джерел [10].

Використовували комерційне поживне середовище MRS-агар. Розплавлене й охолоджене до температури 48–50 °С середовище розливали у чашки Петрі діаметром 90 мм у кількості 15 см<sup>3</sup>. Результати ступеня чутливості до антимікробних препаратів оцінювали за діаметрами зон затримки росту досліджуваних штамів, згідно з рекомендаціями виробника дисків (таблиця). Добові культури тест-організмів доводили густину бактеріальної суспензії до показника 1 за стандартом мутності Мак-Ферлана, підготовлені таким чином суспензії тест-культур у кількості 0,1 см<sup>3</sup> рівномірно розподіляли стерильним шпателем на поверхні агару. Через 20–30 хв після посіву на кожен агарову пластину накладали по 5 дисків з антибіотиками. Чашки інкубували в термостаті протягом 24 год за температури 30 та 37 °С.

### Результати та їх обговорення

Враховуючи той факт, що у ветеринарії для лікування сільськогосподарських тварин широко застосовують антибіотики, нами було вивчено чутливість біфідобактерій (5) та лактобацил (7) до 27 антибіотиків, що належать до 13 груп антимікробних речовин (пеніциліни, цефалоспорини, карбапеніми, аміноглікозиди, тетрацикліни, азаліди, лінкозаміни, поліміксини, фторхінололи тощо).

Результати дослідження стійкості до антибіотиків досліджуваних штамів наведено в таблиці.

З різних природних джерел було вилучено та ідентифіковано штами до роду *Lactobacillus rhamnosus*; *L.acidophilus*; *L.brevis*; *L.paracasei ssp. paracasei*; *L.casei*; *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*; *L.helveticus*; *Bifidobacterium gallinarum*; *B.bifidum*; *B.longum*; *B.infantis*; *B.adolescentis*. Видову належність виділених штамів визначали на підставі детального вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей.

Залежно від діаметра зони затримки росту мікроорганізми поділяються на резистентні, помірно резистентні та чутливі (рисунок).

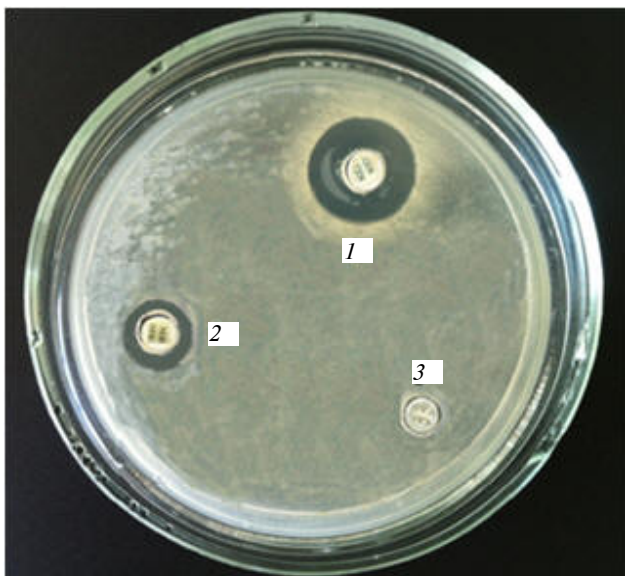
Таблиця. Дослідження стійкості штамів до антибіотиків

№ п/п	Антибіотики	Штами/стійкість до антибіотика											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Група цефалоспоринів													
1	Цефтриаксон	16	8	22	28	30	22	18	14	18	24	12	18
2	Цефазолін	0	7	8	22	20	15	18	0	0	0	10	8
3	Цефтофур	0	15	12	33	32	15	17	0	11	20	0	0
4	Цефепим	0	0	10	10	14	0	12	0	14	20	0	11
5	Цефамексин	0	13	16	16	16	10	13	10	0	20	0	12
6	Цефоперазон	20	16	0	0	11	12	20	14	0	18	10	0
Група аміноглікозидів													
7	Гентаміцин	12	0	0	14	0	14	12	0	0	10	0	0
8	Стрептоміцин	14	18	14	18	17	8	23	16	14	10	14	18
9	Амікацин	10	14	0	0	0	0	8	0	0	0	18	12
10	Неоміцин	8	12	0	0	14	0	10	0	0	10	6	0
11	Канаміцин	7	13	15	14	15	15	17	0	0	8	10	8
Ряд фторхінолів													
12	Цепрофлоксацин	15	8	17	17	16	20	14	16	14	15	0	17
13	Офлоксацин	13	0	17	21	17	14	16	12	12	14	8	14
Група пеніцилінів													
14	Амоксицилін	10	14	18	20	17	11	13	12	16	20	14	16
15	Ампіцилін	12	17	32	26	24	22	21	0	0	12	12	0
Група тетрациклінів													
16	Доксициклін	14	20	32	26	28	10	30	20	14	20	14	15
17	Тетрациклін	14	13	22	21	27	31	26	14	0	21	12	11
Група агзаміцинів													
18	Рифампіцин	25	17	33	24	30	20	24	8	8	26	8	0
Група нітрофуранів													
19	Фурадонін	8	22	26	26	22	26	25	0	20	22	20	18
Група карбапенемів													
20	Меропенем	14	21	0	27	22	26	24	24	20	22	18	25
Група хлорамфеніколу													
21	Левоміцетин	20	20	16	26	20	21	23	18	0	23	0	0
Підклас азалідів													
22	Азитроміцин	20	22	0	0	14	12	16	10	0	12	16	10
23	Еритроміцин	27	30	30	28	30	28	28	10	12	20	8	11
Противірикові засоби													
24	Ітраконазол	0	0	0	0	0	12	16	0	0	0	0	0
Група поліпептидів													
25	Поліміксин	0	8	0	0	10	10	0	0	0	0	8	0
Ряд лінкозамінів													
26	Лінкоміцин	25	16	25	24	12	30	25	20	12	20	10	13
27	Клинзаміцин	24	0	0	0	10	11	24	0	0	0	12	0

Примітка. 1 – *Lactobacillus rhamnosus*; 2 – *L.acidophilus*; 3 – *L.brevis*; 4 – *L.paracasei ssp.paracasei*; 5 – *L.casei*; 6 – *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*; 7 – *L.helveticus*; 8 – *Bifidobacterium gallinarum*; 9 – *B.bifidum*; 10 – *B.longum*; 11 – *B.infantis*; 12 – *B.adolescentis*.

Аналізуючи отримані дані можна сказати, що культури лактобактерій виявилися чутливими до групи тетрациклінів, агзаміцинів, нітрофуранів, карбапенемів, хлорамфеніколу та підкласу азалідів, крім культур *L.rhamnosus*,

*L.acidophilus* та *L.brevis*, які характеризувалися помірною резистентністю до цих груп антибіотиків. Помірну резистентність культури лактобактерій проявляли відносно групи цефалоспоринів, аміноглікозидів та пеніцилінів, а повну



Розмір зони затримки росту залежно від стійкості штаму до антибіотиків: 1 – резистентний ( $d \geq 20$  мм); 2 – помірно резистентний ( $10 \leq d < 20$  мм); 3 – чутливий ( $d < 10$  мм)

резистентність до групи поліпептидів і проти-грибкових засобів.

Культури біфідобактерій, на відміну від лактобактерій, виявилися чутливими лише до групи карбапенемів; помірно резистентними до групи цефалоспоринів, фторхінолів, пеніцилінів, азалідів, тетрациклінів і хлорамфеніколу, а повну резистентність проявили до груп поліпептидів, нітрофуранів, аміноглікозидів та протигрибкових засобів. Особливо слід відзначити культури *B.gallinarum* і *B.bifidum*, які проявляли повну резистентність до більшості груп антибіотиків.

1. Донник И.М. Анализ дисбиотических нарушений в кишечнике птицы промышленного стада // Аграрный вестник Урала. – 2007. – № 6. – С. 36–38.
2. Данилевская Н.В. Фармакостимуляция продуктивности животных пробиотическими препаратами: Автореф. дисс. ... докт. вет. наук. – 2007. – М. – 48 с.
3. Клетикова Л.В. Клиническая и лабораторная оценка влияния пробиотиков на организм кур. – Шуя: ГОУ ВПО “ШГПУ”, 2010. – 78 с.
4. Свеженцов А.И., Коробко В.Н. Нетрадиционные кормовые добавки для животных и птицы: Монография. – Д.: АРТ-ПРЕСС, 2004. – 296 с.
5. Шилов С.О. Иммуный статус, естественный микробиоценоз кишечника птиц и методы их коррекции: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2000. – 22 с.

Аналізуючи сказане вище, можна зробити висновок, що культури *L.rhamnosus*, *L.acidophilus*, *L.brevis* та *B.gallinarum*, *B.bifidum* є найбільш стійкими до основних груп антибіотиків, які найчастіше використовуються у ветеринарній практиці.

### Висновки

Аналізуючи отримані результати дослідження стійкості ідентифікованих штамів до різних груп антибіотиків, які використовуються у ветеринарній практиці, можна сказати, що група лактобактерій виявилась більш чутливою до антибіотиків, на відміну від біфідобактерій. Штами лактобактерій були чутливими до групи тетрациклінів і розрізнялися за стійкістю до всіх інших досліджених груп препаратів. До групи аміноглікозидів культури лактобактерій були помірно стійкими чи резистентними. Всі досліджені штами біфідобактерій були чутливі до групи карбапенемів. У переважної більшості культур виявлено стійкість до групи поліпептидів.

Резистентними відносно більшості антибіотиків були *L.acidophilus* та *B.gallinarum*, а тому вони є перспективними для використання у біотехнологіях комплексних пробиотичних препаратів.

Наступним етапом досліджень стане створення біотехнології комплексного бактеріального препарату на основі перспективних штамів молочнокислих і біфідобактерій.

6. I. Ahmad, “Effect of Probiotics on Broilers Performance”, Int. Journal of Poultry Sci, vol. 5 (6), pp. 593–597, 2006.
7. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. – Кишинев: Штиинца, 1990. – 190 с.
8. E.M. Barnes, “The Isolation and Properties of the Predominant Anaerobic Bacteria in the Caeca of Chickens and Turkeys”, Brit. Poultry Sci, vol. 11(4), pp. 467–481, 1970.
9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. для студ. биол. спец. ун-тов. – [4-е изд., испр. и доп.]. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.
10. K.Y. Gfeller, Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance Determinants of Commensal Lactobacilli, Zurich, 2003, 144 p.