

Антибиотикорезистентность молочнокислых бактерий с пробиотическими свойствами

А.В. БЕГУНОВА,
канд. техн. наук И.В. РОЖКОВА
ВНИИ молочной промышленности

Пробиотические культуры лактобактерий – основные компоненты, которые придают кисло-молочному продукту функциональные свойства. Жизнеспособные молочно-кислые бактерии в кисломолочных продуктах связаны с повышением толерантности к лактозе, хорошо сбалансированной микробиотой кишечника, а также стимулируют иммунную систему, обладают антимикробной активностью и противоопухолевыми, антихолестеринемическими и антиоксидантными свойствами [1].

Наиболее эффективные препараты при лечении бактериальных инфекций – антибиотики. Основным побочным эффектом при антибиотикотерапии является диарея, которая встречается в 5–39 % случаев. Кроме того, использование современных антибактериальных препаратов широкого спектра действия приводит к уменьшению бактериального разнообразия и нарушению микробиоты желудочно-кишечного тракта человека.

Обнаружено, что антибиотики изменяют таксономическую, геномную и функциональную способность микробиоты кишечника человека [2]. Применение антибиотиков способствует обмену генетической информацией между микроорганизмами. Может возникать спонтанная антибиотикорезистентность из-за изменчивости бактериальных геномов [2] или в результате переноса генетического материала из одной клетки в другую. Присутствие генов устойчивости у многих молочно-кислых бактерий и перенос плазмид описаны в обзоре [3].

Микробиота кишечника предотвращает проникновение патогенных микроорганизмов и стимулирует защиту от инфекций. Изменение в составе кишечной

микробиоты может снизить защитные механизмы микробиоты кишечника.

Отмечено, что одновременное использование пробиотических микроорганизмов и антибиотиков снижает заболеваемость, продолжительность и тяжесть диареи [4]. Полезные для здоровья человека свойства пробиотических, в том числе молочнокислых, бактерий интенсивно изучаются. Многочисленные исследования доказали, что пробиотический потенциал разных штаммов лактобактерий одного вида может достаточно сильно варьировать и являться штаммоспецифичной характеристикой [5–7].

Устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам долгое время считалась полезным свойством. Однако в последнее время показано, что молочнокислые бактерии могут быть хранилищем генов устойчивости к антибиотикам и участвовать в передаче этих генов другим микроорганизмам. В литературе есть данные, что чаще всего передаются гены, кодирующие устойчивость к тетрациклину и эритромицину [8].

Природная устойчивость к некоторым антибиотикам свойственна бифидо- и молочнокислым бактериям. Штаммы с природной устойчивостью к антибиотикам считаются пригодными (acceptable) для применения в качестве пробиотиков и заквасок для кисломолочных продуктов [9]. Определены два механизма формирования приобретенной устойчивости к антибиотикам:

- мутации хромосомных генов;
- перенос генов устойчивости к антибиотикам.

Штаммы пробиотических, в том числе молочнокислых, бактерий, устойчивость к антибиотикам которых определяется мутацией генов, относят к «в целом пригодным» (generally acceptable) для применения в производстве пробиотиков и кисломолочных продуктов. Штаммы, у которых есть трансмиссивные гены, способные переносить гены устойчивости к антибиотикам, не могут

быть использованы (not acceptable) в составе пробиотиков и кисломолочных продуктов [9].

В работе С.Г. Ботиной и др. (2011) охарактеризована устойчивость к антибактериальным препаратам лактобацилл, изолированных из кишечника человека. Работа белорусских ученых [10] по тестированию антибиотикорезистентности 34 штаммов бактерий рода *Bifidobacterium* выявила распространение устойчивости к тетрациклину и эритромицину, которая зависит от штамма. Показано, что у изучаемых штаммов *Bifidobacterium* есть гены, кодирующие резистентность к тетрациклину, и гены, детерминирующие устойчивость к эритромицину.

В Центральной лаборатории микробиологии ВНИИМ в настоящее время проводятся исследования по выделению, селекции и изучению различных свойств штаммов пробиотических, в том числе молочнокислых, бактерий с целью разработки заквасок для производства кисломолочных продуктов направленного действия.

Цель работы – оценка устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *Lactobacillus spp.* из коллекции пробиотических бактерий ВНИИМ. Объекты исследований – штаммы *Lactobacillus rhamnosus* TR1, *Lactobacillus acidophilus* NK1 и *Lactobacillus acidophilus* H-9. Штаммы культивировали на стерильном обезжиренном молоке.

Устойчивость к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным способом в соответствии с методом, указанным в МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

В качестве питательной среды использовали MRS-агар («НПЦ Биоконпас-С», Россия), которую разливали в стерильные чашки Петри так, чтобы толщина слоя составляла $4 \pm 0,5$ мм. На поверхность MRS-агара наносили 1 см^3 инокулята исследуемого штамма и равномер-

но распределяли по поверхности питательной среды, затем с помощью стерильного пинцета проводили аппликацию дисков с противомикробными лекарственными средствами (ООО «НИЦФ», Россия). После чашки Петри помещали в анаэробстат «OXOID», для создания анаэробных условий использовали газ-пакеты «GasPak» (BD Bio-sciences, США). Термостатировали при 37 ± 1 °C в течение 18–24 ч.

Устойчивость к антибактериальным препаратам оценивали по зонам задержки роста вокруг дисков. Результаты интерпретировали по МУ 2.3.2.2789–10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». Все исследования проводились в 3–5-кратной повторности.

Проведенные ранее исследования показали выраженные антимикробные свойства штаммов *L. rhamnosus* TR1, *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 при сокультивировании с условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, что является одним из основных показателей пробиотического потенциала [11, 12].

Устойчивость штаммов *L. rhamnosus* TR1, *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 изучали по отношению к антибактериальным препаратам различных групп, применяемым при лечении бактериальных инфекций (см. таблицу).

Штамм *L. rhamnosus* TR1 чувствителен к гентамицину, амоксициллину,

ампициллину и доксициклину, имеет промежуточную устойчивость к канамицину, неомицину, бензилпенициллину, тетрациклину, левофлоксацину и левомицетину и обладает устойчивостью к остальным тестируемым антимикробным препаратам. У штаммов *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 выявлена устойчивость к пемфлосацину, промежуточная устойчивость – неомицину, фосфомицину, чувствительность – антибиотикам группы пенициллинов, группы тетрациклинов, азитромицину, линкомицину, левомицетину, гентамицину.

Штамм *L. acidophilus* H-9 устойчив к левофлоксацину, а штамм *L. acidophilus* NK1 обладает промежуточной устойчивостью к этому антибиотику. Штамм *L. acidophilus* H-9 чувствителен к канамицину, а штамм *L. acidophilus* NK1 обладает промежуточной устойчивостью к этому антибиотику.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что штаммы *L. rhamnosus* TR1, *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 обладают различной антибиотикоустойчивостью. Для более полной характеристики этого показателя необходимо провести генетический анализ, чтобы определить имеют ли штаммы *L. rhamnosus* TR1, *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 переносимые гены устойчивости к антибиотикам.

На основании проведенных исследований установлено, что изученные штаммы относительно устойчивы к антибиотикам и могут быть рекомендованы для применения в составе заквасок для

кисломолочных продуктов или в виде бактериального препарата для нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kullissar, T. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects/ T.Kullissar [et al.]// Brit. J. Nutr. 2003. Vol. 90 (2). P. 444–449.
2. Bagel, S. Impact of gyrA and parC mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of Escherichia coli/ S.Bagel [et al.]// Antimicrob Agents Chemother. 1999. V. 43(4). P. 868–875.
3. Teuber, M. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food/ M.Teuber, L.Meile, F.Schwartz// Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V. 76. P. 115–137.
4. Ouwehand, A.C. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance/ A.C.Ouwehand [et al.]// Ann Med. 2016. V. 48(4). P. 246–255.
5. Owusu-Kwarteng, J. Technological properties and probiotic potential of Lactobacillus fermentum strains isolated from West African fermented millet dough/ J.Owusu-Kwarteng [et al.]// BMC Microbiology. 2015. V. 15. P. 261.
6. Fontana, A. Genomic Comparison of Lactobacillus helveticus Strains Highlights Probiotic Potential/ A.Fontana [et al.]// Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1380.
7. Pino, A. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates/ A.Pino [et al.]// Scientific Reports. 2019. V. 9. P. 3355.
8. Toomey, N. Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs/ N.Toomey, D.Bolton, S.Fanning// Research in Microbiology. 2009. V. 161. P. 127–135.
9. Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance// The EFSA J. 2012. Vol. 10. P. 2740–2750.
10. Сидоренко, А.В Характеристика антибиотикоустойчивости коллекционных, пробиотических и выделенных из кишечника человека штаммов бифидобактерий/ А.В.Сидоренко, Г.И.Новик// Труды БГУ. 2013. Т. 8. Ч. 1. С. 144–151.
11. Федорова, Т.В Антагонистическая активность молочнокислых бактерий Lactobacillus spp. в отношении клинических изолятов Klebsiella pneumoniae/ Т.В.Федорова [и др.]// Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 1.
12. Бегунова, А.В. Антимикробные свойства Lactobacillus в кисломолочных продуктах/ А.В.Бегунова [и др.]// Молочная промышленность. 2020. № 5. С. 50–51.

Устойчивость штаммов *L. rhamnosus* TR1, *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* H-9 к антибактериальным препаратам

Антибактериальный препарат	Количество вещества на диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм (чувствительность)		
		<i>L. rhamnosus</i> TR1	<i>L. acidophilus</i> NK1	<i>L. acidophilus</i> H-9
Гентамицин	120	30 (S)	22 (S)	24 (S)
Канамицин	30	15 (I)	11 (I)	17 (S)
Неомицин	30	18 (I)	13 (I)	16 (I)
Амоксициллин	20	22 (S)	35 (S)	37 (S)
Ампициллин	10	24 (S)	35 (S)	30 (S)
Бензилпенициллин	10	20 (I)	32 (S)	37 (S)
Оксациллин	1	7 (R)	24 (S)	30 (S)
Левофлоксацин	5	13 (I)	15 (I)	– (R)
Пемфлосацин	5	9 (R)	6 (R)	9 (R)
Доксициклин	30	24 (S)	26 (S)	25 (S)
Тетрациклин	30	17 (I)	30 (S)	30 (S)
Азитромицин	15	8 (R)	25 (S)	24 (S)
Линкомицин	15	9 (R)	29 (S)	23 (S)
Левомицетин	30	16 (I)	30 (S)	23 (S)
Фосфомицин	200	9 (R)	14 (I)	15 (I)

Примечание: S – чувствительный, I – промежуточно-чувствительный, R – устойчивый.