



ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

УДК 663.18

Н.В. Донкова, С.А. Донков, М.Ю. Кадетова

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* МЕТОДОМ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

N.V. Donkova, S.A. Donkov, M.Yu. Kadetova

STUDYING THE STABILITY TO ANTIBIOTICS OF BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* BY SERIAL BREEDING METHOD

Донкова Н.В. – д-р с.-х. наук, проф., зав. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Донков С.А. – канд. биол. наук, доц. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Кадетова М.Ю. – студ. 4-го курса Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkova N.V. – Dr. Veterinary Sci., Prof., Head, Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkov S.A. – Cand. Biol. Sci., Assoc. Prof., Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Kadetova M.Yu. – 4-Year Student Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: dnv-23@mail.ru

Цель исследований – изучение устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Bacillus* методом серийных разведений. Представлены результаты исследований по изучению чувствительности пробиотических микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus licheniformis* к антибиотикам. Чувствительность микроорганизмов определяли к левомицетину, тетрациклину и гентамицину. Активность антибиотика устанавливали по величине его минимальной подавляющей концентрации, вызвавшей полную ингибицию прорастания спор. В качестве питательной среды использовали стерильный отвар пшеничных отрубей. Готовили основной раствор антибиотика в концентрации 160,0 мкг/мл, а рабочие растворы – с 2-кратным уменьшением

концентрации антибиотика в каждом последующем разведении. Установлено, что наибольшей устойчивостью к антибиотикам обладает *Bacillus subtilis*, а наименьшей – *Bacillus licheniformis*. Минимальная подавляющая концентрация левомицетина для всех исследованных видов микроорганизмов составила 20 мкг/мл, у тетрациклина она составила 40 мкг/мл, а у гентамицина – 80 мкг/мл. Наибольшую устойчивость испытываемые микроорганизмы проявили по отношению к гентамицину, а наименьшую – к левомицетину. Полученные результаты по устойчивости пробиотиков к антибиотикам необходимо учитывать при отборе штаммов микроорганизмов для применения их совместно с антибиотиками. Для повышения эффективности пробио-

тического препарата, содержащего в своем составе споры *Bacillus subtilis*, его целесообразно применять совместно с гентамицином, так как споры *Bacillus subtilis* сохраняют свою активность при высоких концентрациях этого антибиотика. Наименьшая устойчивость ко всем антибиотикам установлена у *Bacillus licheniformis*, поэтому применять этот микроорганизм в качестве пробиотика следует после завершения антибиотикотерапии.

Ключевые слова: пробиотик, чувствительность пробиотических микроорганизмов, антибиотик, *Bacillus*.

The purpose of the researches was studying the resistance to antibiotics of bacteria of genus Bacillus by method of serial dilutions. The results of the research on studying the sensitivity of pro-biotic microorganisms of Bacillus subtilis, Bacillus cereus and Bacillus licheniformis to antibiotics were presented. The sensitivity of microorganisms to the following antibiotics – chloramphenicol, tetracycline and gentamicin was determined. The antibiotic activity was determined by the value of its minimum inhibitory concentration, which caused a complete inhibition of spore germination. As a nutrient medium sterile decoction of wheat bran served. A basic antibiotic solution was prepared at the concentration of 160.0 µg/ml; working solutions were prepared from it with a 2-fold decrease in the concentration of the antibiotic at each subsequent dilution. Bacillus subtilis was found to be the most resistant to antibiotics, while Bacillus licheniformis had the lowest resistance. The minimum inhibitory concentration of chloramphenicol for all studied microorganism species was 20 µg /ml, for tetracycline it was 40 µg/ml, and for gentamicin – 80 µg/ml. Test subjects showed the greatest resistance to microorganisms in relation to gentamicin, and the least to chloramphenicol. The results obtained on the resistance of probiotics to antibiotics must be considered when selecting strains of microorganisms for use in conjunction with antibiotics. To increase the effectiveness of probiotic preparation containing in its composition the spores of the microorganism Bacillus subtilis, it is advisable to use it in conjunction with gentamicin, since the spores of Bacillus subtilis retain their activity at high concentrations of this antibiotic. The least resistance to all antibiotics was established in Bacillus licheniformis, therefore,

this microorganism should be used as a probiotic after the completion of antibiotic therapy.

Keywords: probiotic, probiotic microorganisms' sensitivity, antibiotic, *Bacillus*.

Введение. Основным этиологическим фактором в возникновении желудочно-кишечных заболеваний у сельскохозяйственных животных является группа энтеропатогенных бактерий. К этой группе относятся такие микроорганизмы, как кишечная палочка, сальмонелла, синегнойная палочка, клебсиелла, шигелла, протей и другие. С целью подавления их роста применяют антибиотики, но при этом от антибиотиков в желудочно-кишечном тракте гибнут не только патогенные, но и полезные микроорганизмы, которые заселяют желудочно-кишечный тракт в норме и участвуют в процессах пищеварения. Поэтому нередко после применения антибиотиков у животных наблюдается дисбактериоз – расстройство пищеварения, связанное с гибелью в желудочно-кишечном тракте полезных микроорганизмов.

Для преодоления этой проблемы для лечения животных в последние годы одновременно с антибиотиками внутрь стали применять препараты, содержащие в своем составе полезные микроорганизмы. Эти микроорганизмы заселяют желудочно-кишечный тракт и тем самым восстанавливают его нормальную микрофлору и пищеварение. Такие микроорганизмы получили название «пробиотики» (pro – для, bios – жизнь). Кроме участия в пищеварительных процессах, пробиотики являются антагонистами по отношению к энтеропатогенным бактериям, чем обусловлен их лечебно-профилактический эффект. Совместное применение антибиотиков с пробиотиками позволяет наряду с уничтожением патогенных микроорганизмов сохранить микробиоценоз в кишечнике, не нарушая его функционирования. Поэтому одним из критериев отбора штаммов микроорганизмов с целью использования их в пробиотических препаратах является определение их устойчивости к антибиотикам.

Применяемые в настоящее время в ветеринарии пробиотические препараты содержат в своем составе живые микроорганизмы из семейства *Lactobacillus* или *Bifidobacterium* [1], но в последние годы в пробиотические препараты

стали вводить спорообразующие микроорганизмы из рода *Bacillus*, такие как *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis* [2].

Особенностью пищеварения у жвачных животных является то, что поедаемый растительный корм накапливается в рубце, а вместе с кормом в рубец в большом количестве попадают микроорганизмы, которые становятся его постоянными обитателями. Стенка рубца не выделяет пищеварительных ферментов, ферменты продуцируют микроорганизмы рубца. Для жвачных животных особенно актуальны спорообразующие микроорганизмы из рода *Bacillus*. Споры в рубце прорастают и при этом они выделяют амилалитические и целлюлозолитические ферменты, которые расщепляют крахмал и целлюлозу растений до глюкозы.

Основное предназначение пробиотических микроорганизмов – это восстановление нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта после перенесенного заболевания. В опытах на сельскохозяйственных животных и птице было установлено, что скармливание пробиотиков увеличивает у них молочную продуктивность и приросты живой массы [3–6]. В связи с этим для животноводства актуальным является вопрос о способах применения пробиотиков – либо совместно с кормовыми антибиотиками, либо в составе кормовых добавок как с лечебно-профилактической целью, так и с целью увеличения у них продуктивности.

На сегодняшний день активность антибиотиков в отношении бацилл, применяемых в пробиотических препаратах, изучена недостаточно, между тем как оценка чувствительности бацилл к антибиотикам позволяет получить необходимую информацию для обоснования рационального применения антибиотиков совместно с пробиотиками при сохранении жизнеспособности последних. Об эффективности совместного применения антибиотиков с пробиотиками сообщают авторы [7].

Цель исследований: изучение устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Bacillus* методом серийных разведений.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) изучить устойчивость к антибиотикам микроорганизмов рода *Bacillus*; 2) определить минимальные подавляющие концентрации антибиотиков (МПК) к различным

видам микроорганизмов рода *Bacillus*; 3) установить оптимальные сочетания антибиотиков с пробиотиками (in vitro) для их совместного эффективного использования.

Материал и методы исследований. Объектом исследований являлись споры микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus licheniformis*. Микроорганизмы выделены и идентифицированы из предоставленного нами материала в ГосНИИ генетика (г. Москва). Микроорганизмы используются нами для производства кормовой патоки посредством гидролиза крахмала. Одновременно эти микроорганизмы, входящие в состав патоки, проявляют свойства пробиотиков [8].

Изучение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводили методом серийных разведений. За основу были взяты методические указания [9]. Чувствительность микроорганизмов определяли к следующим антибиотикам – левомицетину, тетрациклину и гентамицину.

Активность антибиотика устанавливали по величине его минимальной подавляющей концентрации, вызвавшей полную ингибицию прорастания спор.

Метод серийных разведений осуществляли в пробирках объемом по 10 мл. В качестве питательной среды использовали стерильный отвар пшеничных отрубей. Готовили основной раствор антибиотика в концентрации 160,0 мкг/мл, из него готовили рабочие растворы с 2-кратным уменьшением концентрации антибиотика в каждом последующем разведении. В каждую пробирку вносили споры определенного микроорганизма в количестве 100 тыс. спор/мл. Для каждого микроорганизма готовили по 5 серий разведений одного из антибиотиков.

Заключение об устойчивости микроорганизмов к антибиотикам делали на основании подсчета разницы между количеством спор испытуемого микроорганизма, внесенных в начале эксперимента, и количеством проросших спор по окончании культивирования в присутствии заданной концентрации антибиотика. Подсчет микроорганизмов проводили согласно методике, описанной в [10], с использованием микроскопа МИКМЕД-5 и камеры Горяева. Параллельно ставили контрольную пробу со спорами, но без антибиотика. Пробирки инкубировали в термостате при $t = 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение одних суток.

Для получения статистически достоверных результатов все исследования проводили с 3-кратной повторяемостью.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента в программном пакете MS Excel 2010. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований. В контрольных пробирках без антибиотика наблюдали 100 %-е прорастание спор каждого изучаемого вида микроорганизма.

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что прорастание спор всех исследуемых видов бацилл начиналось при содержании левомицетина в пробирке в концентрации, равной 10 мкг/мл.

Таблица 1

Количество проросших спор бацилл в среде с левомицетином

Содержание левомицетина в пробирке, мкг/мл	Количество проросших спор/мл		
	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. cereus</i>	<i>Bac. licheniformis</i>
80	-	-	-
40	-	-	-
20	-	-	-
10	50000±12,3	40000±9,1	25000±7,2
5	85000±16,7	70000±14,5	55000±11,8

На графике, представленном на рисунке 1, видно, что с увеличением в пробирке концентрации левомицетина количество проросших

спор в среде уменьшалось, при содержании левомицетина в концентрации 20 мкг/мл споры не прорастали.

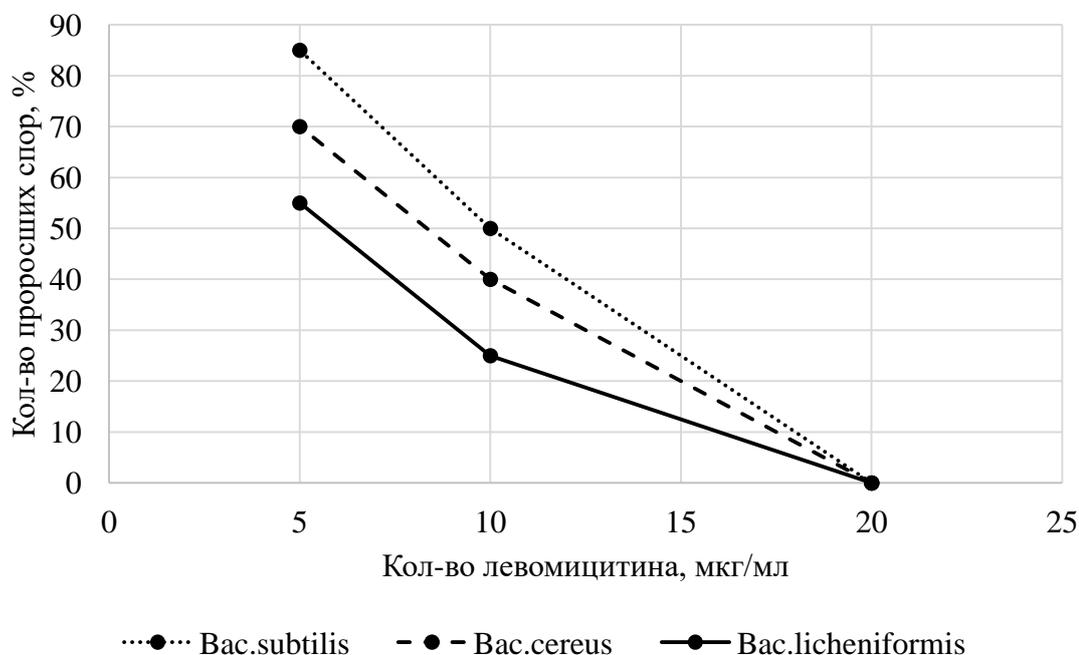


Рис. 1. Динамика прорастания спор бацилл при левомицетине

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что прорастание спор всех исследуемых видов бацилл начиналось при содержании тетрациклина в пробирке в концентрации, равной 20 мкг/мл.

Таблица 2

Количество проросших спор в среде с тетрациклином

Содержание тетрациклина в пробирке, мкг/мл	Количество проросших спор/мл		
	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. cereus</i>	<i>Bac. licheniformis</i>
80	-	-	-
40	-	-	-
20	25000±11,5	15000±12,4	5000±8,7
10	60000±14,8	45000±13,8	25000±14,1
5	90000±15,7	80000±16,7	65000±15,9

На графике, представленном на рисунке 2, видно, что с увеличением в пробирке концентрации тетрациклина количество проросших спор в среде уменьшалось, при содержании тетрациклина в концентрации 40 мкг/мл споры не проросли.

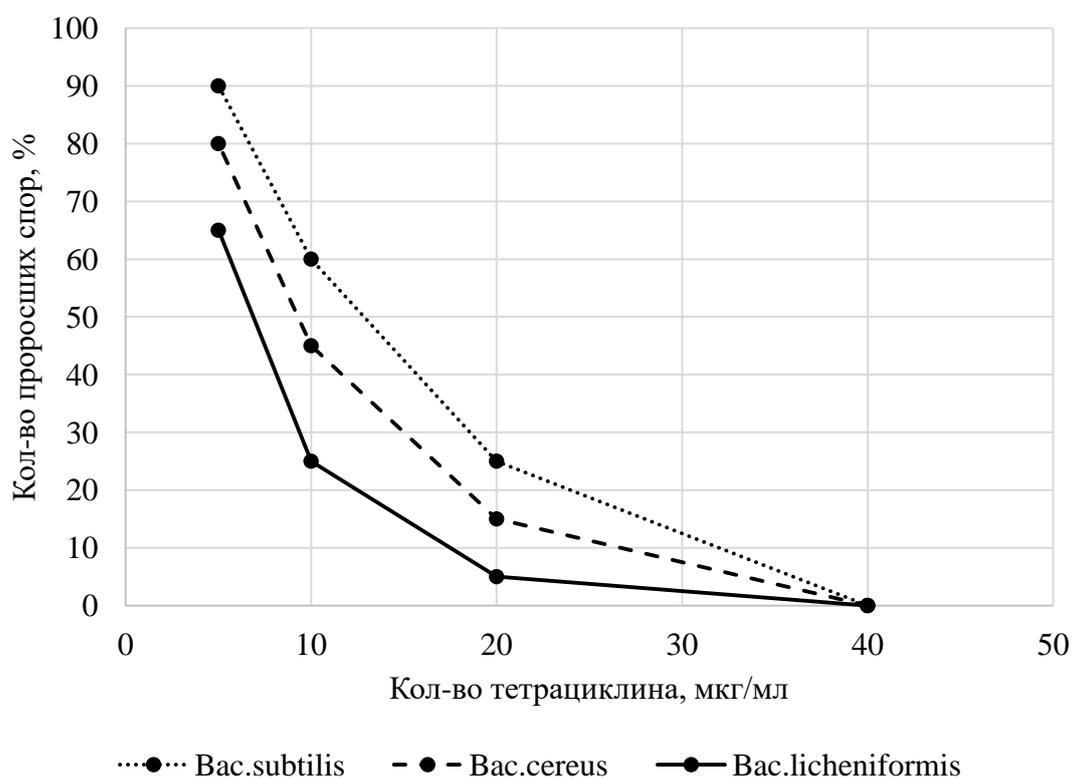


Рис. 2. Динамика прорастания спор бацилл при тетрациклине

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что прорастание спор всех исследуемых видов бацилл начиналось при содержании гентамицина в пробирке в концентрации, равной 40 мкг/мл.

На графике рисунка 3 видно, что с увеличением в пробирке концентрации гентамицина количество проросших спор в среде уменьшалось, при содержании левомицетина в концентрации 80 мкг/мл споры не проросли.

Количество проросших спор бацилл в среде с гентамицином

Содержание гентамицина в пробирке, мкг/мл	Количество проросших спор/мл		
	<i>Bac. subtilis</i>	<i>Bac. cereus</i>	<i>Bac. licheniformis</i>
80	-	-	-
40	40000±16,8	30000±14,7	10000±8,6
20	65000±18,4	50000±17,6	25000±12,4
10	85000±21,4	70000±19,4	50000±16,8
5	100000±22,5	90000±21,6	70000±20,5

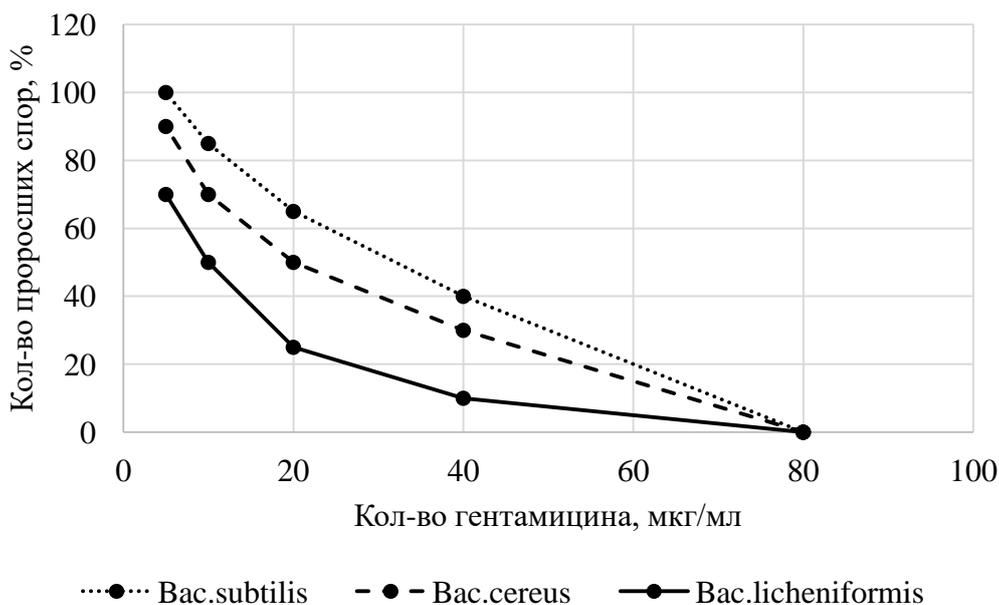


Рис. 3. Динамика прорастания спор бацилл при гентамицине

Выводы. На основании результатов проведенных исследований по изучению устойчивости к антибиотикам пробиотических микроорганизмов можно заключить следующее: по устойчивости к антибиотикам микроорганизмы располагались в следующем убывающем порядке – *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis*.

Минимальная подавляющая концентрация левомицетина для всех исследованных видов микроорганизмов составила 20 мкг/мл, у тетрациклина – 40 мкг/мл, а у гентамицина – 80 мкг/мл. При этом наиболее устойчивым к изучаемым антибиотикам оказался микроорганизм *Bacillus subtilis*, его споры прорастали лучше, чем споры других видов бацилл при наличии в среде одного и того же антибиотика в одинаковых концентрациях. Хуже всего в присутствии антибиотиков прорастали споры микроорганизма *Bacillus licheniformis*.

Наибольшая устойчивость у всех испытуемых микроорганизмов оказалась к гентамицину, а наименьшая – к левомицетину.

Данные по устойчивости пробиотиков к антибиотикам необходимо учитывать при отборе штаммов микроорганизмов для применения их совместно с антибиотиками.

Для повышения эффективности пробиотического препарата, содержащего в своем составе споры микроорганизма *Bacillus subtilis*, его целесообразно применять совместно с гентамицином, так как при таком сочетании прорастает наибольшее количество спор этого пробиотического микроорганизма.

Наименьшая устойчивость ко всем антибиотикам была установлена у *Bac. licheniformis*, поэтому применять данный микроорганизм в качестве пробиотика следует после завершения антибиотикотерапии.

Литература

1. Смирнов В.В., Коваленко Н.К., Подгорский В.С. и др. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // Микробиологический журнал. – 2002. – Т. 64, № 4. – С. 62–78.
2. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2. – С. 32–33.
3. Андреева А.В., Кадырова Д.В. Влияние пробиотика «Споровит комплекс» на динамику роста и развития телят // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2010. – № 4. – С. 125–128.
4. Белик С.Н., Чистяков В.А., Крючкова В.В. и др. Эффективность использования пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis* при выращивании цыплят-бройлеров // Изв. Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. – 2014. – № 4 (36). – С. 151–156.
5. Мурленков Н.В., Абрамова Н.В. Эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в технологии выращивания молочных телят // Вестн. аграр. науки. – 2018. – № 3 (72). – С. 92–100.
6. Смирнова Е.А. Технология производства пробиотика КД-5 и его использование в свиноводстве: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2009. – 23 с.
7. Володченко В.Ф., Садуллоева Т.И. Оценка перспектив комплексного применения антибиотиков и пробиотиков при лечении инфекционных заболеваний // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11 (20), № 2. – С. 269–270.
8. Донкова Н.В., Донков С.А. Антагонистическая активность амилалитических штаммов бактерии *Bacillus subtilis* // Вестн. КрасГАУ. – 2016. – № 7. – С. 173–179.
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: метод. указания / Федер. центр госсанэпиднадзора Минздрава России. – М., 2004. – 91 с.
10. ОФС.1.7.2.0008.15. Определение концентрации микробных клеток [Электрон. ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420339016> (дата обращения: 01.02.2019).

Literatura

1. Smirnov V.V., Kovalenko N.K., Podgorskij V.S. i dr. Probiotiki na osnove zhivykh kul'tur mikroorganizmov // Mikrobiologicheskij zhurnal. – 2002. – Т. 64, № 4. – С. 62–78.
2. Pohilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotiki na osnove sporoobrazujushhih bakterij i ih bezopasnost' // Himicheskaja i biologicheskaja bezopasnost'. – 2007. – № 2. – С. 32–33.
3. Andreeva A.V., Kadyrova D.V. Vlijanie probiotika «Sporovit kompleks» na dinamiku rosta i razvitija teljat // Voprosy normativno-pravovogo regulirovanija v veterinarii. – 2010. – № 4. – С. 125–128.
4. Belik S.N., Chistjakov V.A., Krjuchkova V.V. i dr. Jefferektivnost' ispol'zovanija probioticheskogo preparata na osnove *Bacillus subtilis* pri vyrashhivanii cypljat-brojlerov // Izv. Nizhnevolzhskogo agrouniversitetskogo kompleksa. – 2014. – № 4 (36). – С. 151–156.
5. Murlenkov N.V., Abramkova N.V. Jefferektivnost' primenenija biopreparatov na osnove bakterij roda *Bacillus* v tehnologii vyrashhivaniya molochnyh teljat // Vestn. agrar. nauki. – 2018. – № 3 (72). – С. 92–100.
6. Smirnova E.A. Tehnologija proizvodstva probiotika KD-5 i ego ispol'zovanie v svinovodstve: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – М., 2009. – 23 s.
7. Volodchenko V.F., Sadulloeva T.I. Ocenka perspektiv kompleksnogo primenenija antibiotikov i probiotikov pri lechenii infekcionnyh zabolevanij // Rossijskij immunologicheskij zhurnal. – 2017. – Т. 11 (20), № 2. – С. 269–270.
8. Donkova N.V., Donkov S.A. Antagonisticheskaja aktivnost' amiloliticheskikh shtammov bakterii *Bacillus subtilis* // Vestn. KrasGAU. – 2016. – № 7. – С. 173–179.
9. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: metod. Ukazaniya / Feder. centr gossanjepidnadzora Minzdrava Rossii. – М., 2004. – 91 s.
10. OFS.1.7.2.0008.15. Opredelenie koncentracii mikrobnyh kletok [Jelektron. resurs]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420339016> (data obrashhenija: 01.02.2019).