

Научная статья

УДК 579.62, 579.26

doi: 10.37670/2073-0853-2021-88-2-168-173

## Исследование потенцированного эффекта антимикробных препаратов в отношении пробиотических штаммов микроорганизмов

Мария Сергеевна Мирошникова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Оренбургский государственный университет

<sup>2</sup> Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук

**Аннотация.** Проблема антибиотикорезистентности патогенных и условно-патогенных штаммов в настоящее время является одной из ключевых проблем в лечении инфекционных патологий. Одним из возможных подходов использования антибактериальных препаратов является исследование потенцированного и аддитивного эффектов их сочетанного применения в комплексе с пробиотическими штаммами, обладающими высокими антагонистическими характеристиками. В работе представлены экспериментальные данные по отбору штаммов кандидатов рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов ветеринарного назначения, для оценки их возможного использования в комплексе с антибактериальными препаратами из цефалоспориновой и аминогликозидной групп. Полученные результаты исследования, проведенные с использованием диско-диффузионного и нефелометрического методов, свидетельствуют о высоком уровне перспективности использования комбинационных пар: гентамицина с *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* ВКПМ В-10641, стрептомицина с *B. subtilis* ВКПМ В-10641, цефотаксима с *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643, цефепима с *B. subtilis* ВКПМ В-10641, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643.

**Ключевые слова:** пробиотики, антибактериальные препараты, аминогликозиды, цефалоспорины, резистентность.

**Для цитирования.** Мирошникова М.С. Исследование потенцированного эффекта антимикробных препаратов в отношении пробиотических штаммов микроорганизмов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2021. № 2 (88). С. 168–173. doi: 10.37670/2073-0853-2021-88-2-168-173.

Original article

## Study of the potentiated effect of antimicrobial drugs against probiotic strains of microorganisms

Maria S. Miroshnikova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Orenburg State University

<sup>2</sup> Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences

**Abstract.** The problem of antibiotic resistance of pathogenic and opportunistic strains is currently one of the key problems in the treatment of infectious pathologies. One of the possible approaches to the use of antibacterial drugs is to study the potentiated and additive effects of their combined use in combination with probiotic strains with high antagonistic characteristics. This work presents experimental data on the selection of candidate strains of the genus *Bacillus*, which are part of probiotic preparations for veterinary purposes, to assess their possible use in combination with antibacterial drugs from the cephalosporin and aminoglycoside groups. The obtained results of the study carried out using disk-diffusion and nephelometric methods indicate a high level of promising use of combination pairs: gentamicin with *B. subtilis* 534 and *B. subtilis* VKPM B-10641, streptomycin with *B. subtilis* VKPM B-10641, cefotaxime with *B. amyloliquefaciens* VKPM B-10643, cefepime with *B. subtilis* VKPM B-10641, *B. amyloliquefaciens* VKPM B-10642 and *B. amyloliquefaciens* VKPM B-10643.

**Keywords:** probiotics, antibacterial drugs, aminoglycosides, cephalosporins, Resistance.

**For citation.** Miroshnikova M.S. Study of the potentiated effect of antimicrobial drugs against probiotic strains of microorganisms. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2021; 88(2): 168–173. (In Russ.). doi: 10.37670/2073-0853-2021-88-2-168-173.

Масштабное и зачастую бесконтрольное использование антимикробных препаратов в медицинской, ветеринарной и пищевой отраслях деятельности человека приводит к формированию резистентных форм микроорганизмов, входящих в структуру микробиома кишечника. При высокой степени коммуникации как внутривидового, так и межвидового взаимодействия, основанного на горизонтальном способе пере-

носа генов, в котором участвуют плазмиды, транспозоны и интегранны [1], не исключена возможность передачи информации о механизмах резистентности патогенным и условно-патогенным штаммам микроорганизмов и, как следствие, увеличения спектра их устойчивости к антимикробным химиопрепаратам, вплоть до формирования штаммов из категории суперинфекций. Примером такого взаимодействия

может служить штамм *S. aureus* MRSA. Согласно статистическим данным, только в странах Евросоюза ежегодно регистрируется свыше 25 тыс. летальных исходов от инфекционных заболеваний, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов. В общую картину развития антибиотикорезистентных штаммов весомый вклад вносит отрасль животноводства, так как на её долю приходится более половины всех производимых антибактериальных препаратов с преимущественным их использованием в качестве кормовых антибиотиков [2].

Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о негативном опосредованном влиянии кормовых и клинически значимых антибиотиков, используемых в животноводстве, на продукты переработки животноводческой продукции. Это обусловлено переносом антибиотикорезистентной эндогенной кишечной комменсальной микробиоты животных на человеческую популяцию [3, 4].

Наиболее перспективной альтернативой использования антибиотиков в различных отраслях деятельности человека, а в частности в животноводстве, является использование пробиотиков или микроорганизмов прямого откорма (Direct-Fed Microbials, DFMs) [5, 6]. Их структура представлена жизнеспособными, естественными микробными культурами родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Propionibacterium*, которые позволяют моделировать видовое биоразнообразие микробиома кишечника, повышая тем самым физиолого-адаптационные характеристики организма животных [7, 8].

Пробиотические штаммы наряду с активным участием в обменных процессах организма хозяина [9] проявляют выраженный антагонизм, который стал в настоящее время альтернативным способом профилактики и лечения инфекционных патологий животных.

В экспериментальных исследованиях *in vitro* установлен выраженный аддитивный эффект комбинаций пробиотических штаммов *E. coli* M-17 в комплексе с антибиотиком эритромицин и *E. faecium* с ампицилином и цефоперазоном соответственно в отношении *S. enteritidis* [10]. Модельные экспериментальные исследования эффективности сочетанного применения пробиотических и антибиотических препаратов при лечении экспериментальной сальмонеллёзной инфекции также позволяют судить о высокой степени аддитивного эффекта пробиотического бинарного препарата Биоспорин на основе *B. subtilis* 3 и *B. licheniformis* 31 с цефотаксимом [11, 12].

Анализ литературных данных свидетельствует о высоком уровне актуальности и практической значимости исследований, направленных

на разработку комплексных методов лечения инфекционных заболеваний с применением антибактериальных препаратов и резистентных по отношению к ним аддитивно действующих пробиотических штаммов.

**Целью настоящей работы** является исследование потенцированного эффекта антимикробных препаратов в отношении пробиотических штаммов микроорганизмов.

**Материал и методы.** В качестве объектов исследования использовались чистые культуры пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*: Споробактерин (основа препарата *B. subtilis* 534, производитель – ООО «Бакорен», г. Оренбург, Россия), Ветом 1 (основа препарата *B. subtilis* штамм ВКПМ В-10641 (DSM 24613), Ветом 3 (основа препарата *B. amiloliquefaciens* 10642 штамм (DSM 24614), Ветом 4 (основа препарата *B. amiloliquefaciens* 10643 штамм (DSM 24615)). **Производителем препаратов Ветом** является НФП «Исследовательский центр» ООО (Россия).

В качестве регулирующих факторов в работе применялись антимикробные вещества из двух классов антибиотиков –  $\beta$ -лактамы антибиотиков группы цефалоспоринов (цефотаксим, цефепим), аминогликозиды (канамицин, гентамицин, стрептомицин).

Для реализации поставленной перед нами цели в работе использовались диско-диффузионный и нефелометрический методы.

Использование диско-диффузионного метода проводилось в соответствии с общепринятой методикой. В стерильную чашку Петри заливали 20 мл питательной среды (ГРМ-агар), при этом обязательным критерием являлась равномерная заливка. С этой целью чашки располагали на поверхности, выровненной по уровню. После полного застывания и подсушивания на поверхность среды наносили 100 мкл суспензии микроорганизмов в концентрации  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл с последующим её распределением по всей поверхности субстрата стерильным микробиологическим шпателем (посев газонов). Диски, содержащие антибиотики, распределяли на поверхности газона на расстоянии 2 см – от края чашки Петри и 4 см – на удалении друг от друга. Чашки помещали в термостат на 24 ч. при температуре 37 °С, во избежание искажения данных, вызванных размыванием газона конденсационной водой, чашки помещали дном вверх. Для получения достоверных данных исследование проводилось в пятикратной повторности.

Оценка ингибирующего действия антибиотиков проводилась визуально, путём замера зон подавления роста микроорганизма вокруг диска в мм.

Для проведения нефелометрического метода рабочий раствор антибиотика готовили из анти-

биотического препарата, растворённого в физиологическом растворе. Концентрацию рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, учитывая фактор разбавления препарата при последующей инокуляции.

Многоканальной пипеткой в 96-луночный планшет в каждую лунку вносили 100 мкл жидкой питательной среды МПА. Затем в первую лунку при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили 50 мкл максимальной концентрации рабочего раствора антибактериального препарата. Тщательно пипетировали и новым стерильным наконечником переносили 50 мкл раствора антибиотика в бульоне во вторую лунку, содержащую первоначально 100 мкл бульона. Эту процедуру повторили, пока не был приготовлен весь необходимый ряд разведений. Таким образом, получили ряд лунок с растворами антибиотика, концентрации которых отличаются в соседних лунках в 2 раза.

Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту МакФарланда. По 50 мкл инокулята вносили в каждую лунку, содержащую соответствующее разведение антибактериального препарата.

При проведении инкубации планшет закрывали крышкой для предотвращения высыхания содержимого лунок. Инкубировали в обычной атмосфере при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Учёт результатов проводили визуально и спектрофотометрически. За МПК принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма.

**Результаты исследования.** Предварительный этап экспериментальных изысканий в рамках проводимого исследования был направлен на оценку ингибирующих характеристик антибактериальных химиопрепаратов, входящих в состав различных групп по химическому строению и механизму действия: β-лактамы антибиотики группы цефалоспоринов (цефотаксим) и аминогликозиды (канамицин и гентамицин), в отношении пробиотических штаммов рода *Bacillus*: *B. subtilis* 534, *B. subtilis* ВКПМ В-10641, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643. Для реализации поставленной перед нами задачи использовался диско-диффузионный метод.

Использование данной методики позволяет визуально оценить степень выраженности ингибирующего действия антибактериальных препаратов в отношении исследуемых тест-организмов. На основании полученных экспериментальных данных нами был произведён замер зон подавления роста изучаемых микроорганизмов (табл. 1).

Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют о выраженном бактерицидном действии всех исследуемых препаратов в отношении *B. subtilis* 534, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643.

При анализе экспериментальных данных по оценке уровня резистентности исследуемых пробиотических штаммов в отношении *B. subtilis* штамм ВКПМ В-10641 регистрируется высокий уровень чувствительности к цефотаксиму. Минимальная зона подавления роста у данного микроорганизма была зарегистрирована в отношении гентамицина, в то время как в отношении канамицина установлена выраженная резистентность. Наиболее чувствительным в отношении всех исследуемых антибактериальных препаратов является *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642, что фактически свидетельствует об отсутствии перспективности его использования в комплексе с препаратами исследуемых групп.

Для оценки уровня потенцированного воздействия антибактериальных препаратов в отношении тест-организмов нами использовался нефелометрический метод определения относительной оптической плотности роста популяции микроорганизмов в присутствии различных концентраций антибактериальных соединений. Преимуществом используемой методики является возможность оценки уровня ингибирующих характеристик в структуре аналогового исследования, позволяющего в свою очередь исключить погрешность влияния экзогенных факторов. В качестве тестируемых антибактериальных соединений на данном этапе выполнения работы нами использовались аминогликозиды (гентамицин, стрептомицин), β-лактамы антибиотики группы цефалоспоринов (цефотаксим и цефепим).

По результатам замера относительной оптической плотности нами были построены диаграммы для анализа и систематизации полученных результатов (рис. 1–4).

#### 1. Оценка влияния антибиотиков на пробиотические микроорганизмы (зоны подавления роста в миллиметрах) ( $X \pm Sx$ )

Препарат	<i>B. subtilis</i> 534	<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-10641	<i>B. amyloliquefaciens</i> ВКПМ В-10642	<i>B. amyloliquefaciens</i> ВКПМ В-10643
Канамицин	28,3 ± 1,67	R	≥40	33,0 ± 1,00
Гентамицин	32,3 ± 1,45	36,3 ± 0,67	≥40	36,7 ± 0,33
Цефотаксим	38,7 ± 1,33	39,0 ± 1,00	≥40	29,7 ± 0,88

**Примечание:** R – резистентен.

Анализ плотности роста популяции исследуемых микроорганизмов в присутствии различных концентраций гентамицина свидетельствует об ингибирующем действии данного антибактериального препарата в отношении *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 при концентрации от 1,96 до 250 мг/мл и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643, для которого выявлено максимально значимое подавление роста при концентрациях антибиотика от 7,81 до 250 мг/мл.

Относительную резистентность из всех исследуемых пробиотических штаммов в отношении данного антибиотика проявляют *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* ВКПМ В-10641, которые в большинстве из исследуемых концентраций имели максимальные значения плотности роста, что гипотетически подразумевает высокий уровень перспективности использования данных препаратов в комплексе с гентамицином для дальнейших исследований, направленных на комбинированное их использование (рис. 1).

Оценка ингибирующего действия стрептомицина в отношении исследуемых микроорганизмов имеет определённые отличия бактерицидности в сравнении с гентамицином. Штамм *B. subtilis* ВКПМ В-10641 имеет относительно стабильные значения плотности роста независимо от концентрации по сравнению с другими тест-организмами.

В отношении других пробиотических препаратов данное антимикробное средство проявляет более выраженное ингибирующее действие (рис. 2).

Обобщённый анализ оценки степени влияния цефотаксима на рост исследуемых микроорганизмов показал, что наиболее выраженной резистентностью в отношении данного антибиотика обладает штамм *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643 при концентрациях от 0,001 до 1,95 мг/мл. Минимальные значения плотности роста популяции по отношению к остальным пробиотикам в присутствии данного химиопрепарата были зарегистрированы у *B. subtilis* 534 (рис. 3).

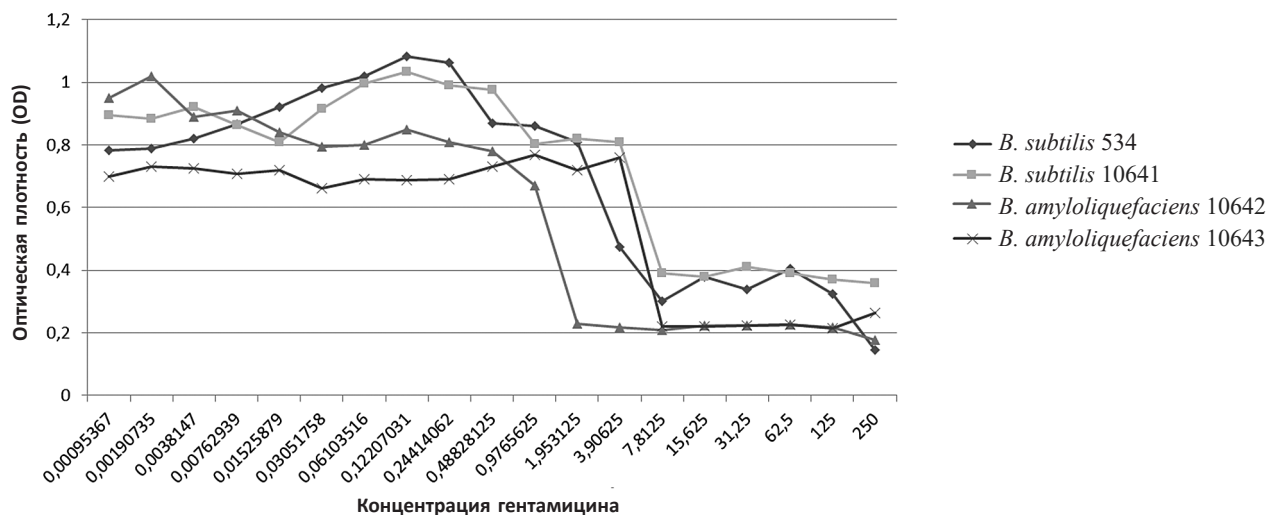


Рис. 1 – Оценка влияния различных концентраций гентамицина на рост популяции тест-организмов посредством определения относительной оптической плотности (OD)

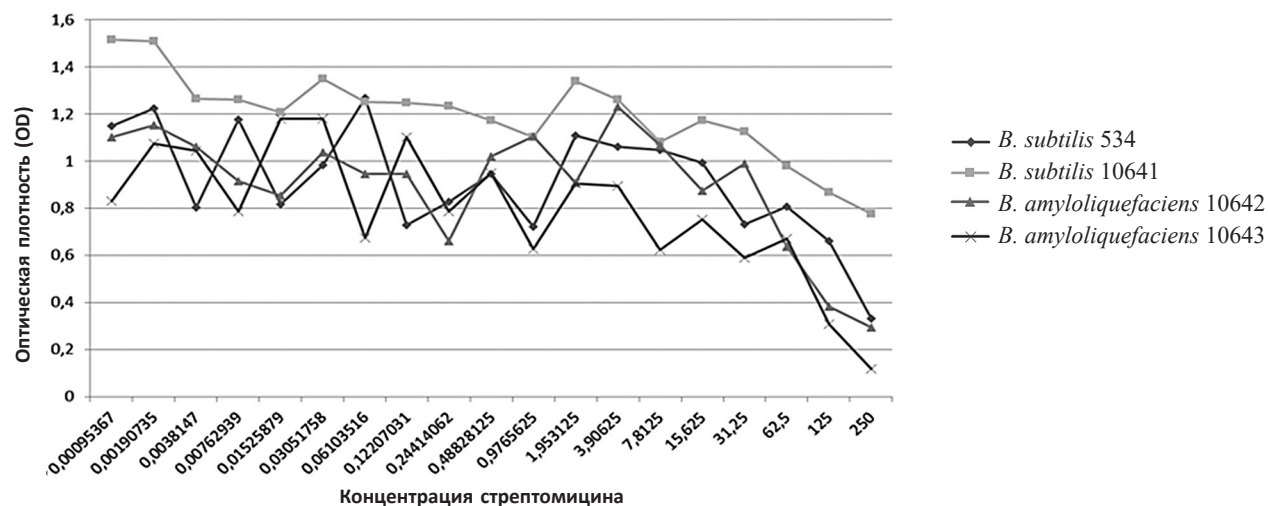


Рис. 2 – Оценка влияния различных концентраций стрептомицина на рост популяции тест-организмов посредством определения относительной оптической плотности (OD)



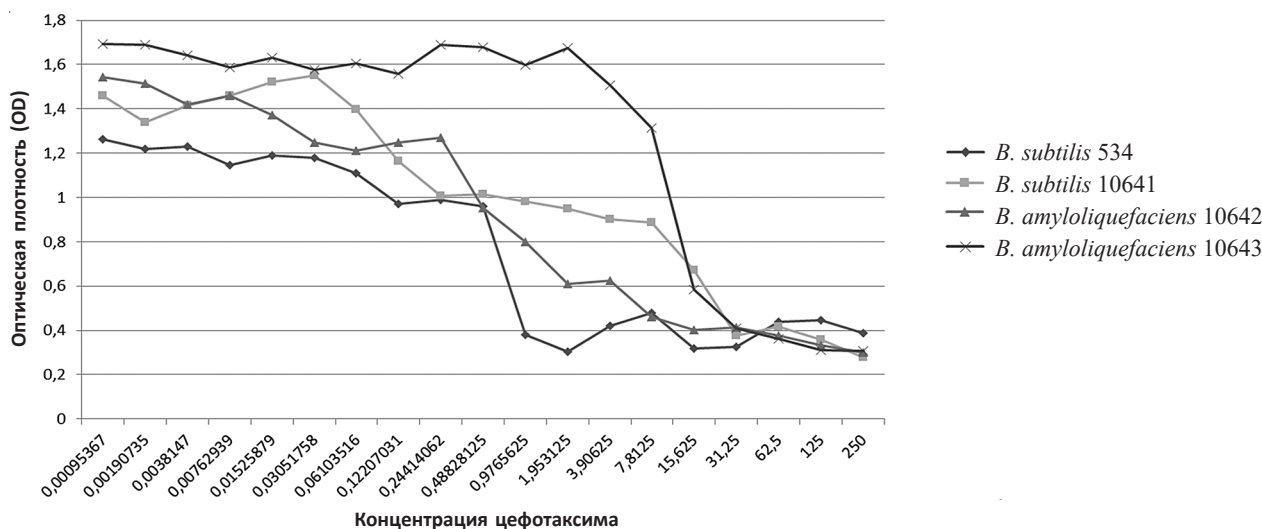


Рис. 3 – Оценка влияния различных концентраций цефотаксима на рост популяции тест-организмов посредством определения относительной оптической плотности (OD)

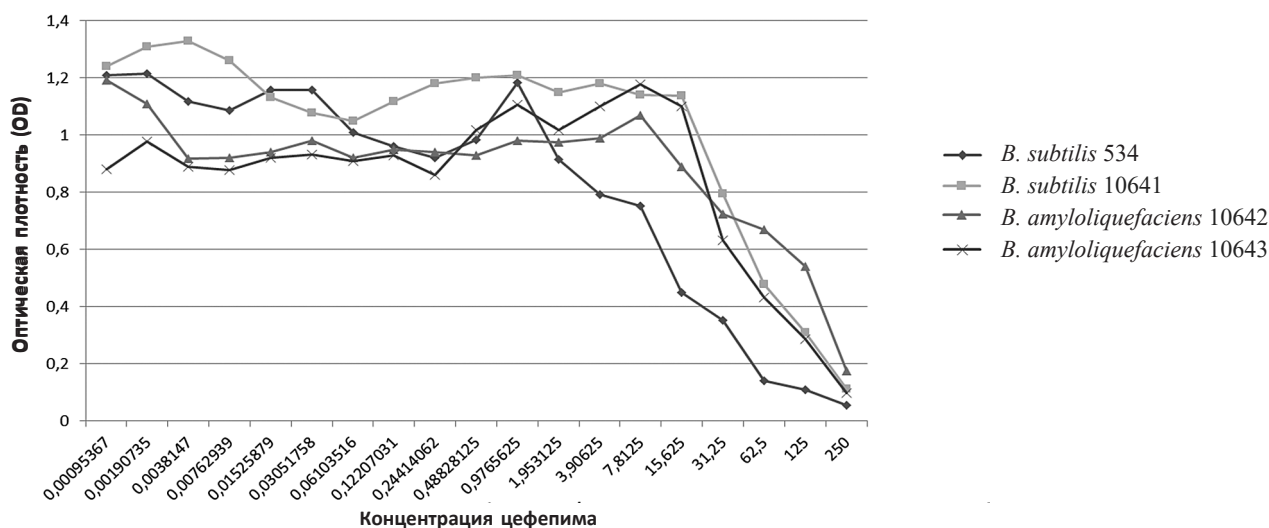


Рис. 4 – Оценка влияния различных концентраций цефепима на рост популяции тест-организмов посредством определения относительной оптической плотности (OD)

В отношении широкого диапазона концентраций цефепима (от 0,001 до 1,95 мг/мл) все пробиотические препараты проявляют относительно высокий уровень резистентности. Относительно стабильно высокие показатели устойчивости к антибиотику зарегистрированы у *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10641 при концентрациях от 0,001 до 15,6 мг/мл. Однако по мере увеличения концентрации препарата у исследуемых штаммов регистрируется снижение плотности популяции микроорганизмов, особенно ярко данное явление выражено у *B. subtilis* 534 (от 1,95 до 250 мг/мл) (рис. 4).

**Выводы.** Проводимые экспериментальные исследования позволяют с высоким уровнем достоверности свидетельствовать об относительно высоком уровне резистентности штамма *B. subtilis* ВКПМ В-10641, входящего в препарат Ветом-1, в отношении гентамицина,

стрептомицина и цефепима. При этом наиболее перспективными комбинационными парами для проведения дальнейших исследований, направленных на оценку сочетанного аддитивного эффекта, являются: гентамицин с *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* ВКПМ В-10641, стрептомицин с *B. subtilis* ВКПМ В-10641, цефотаксим с *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643, цефепим с *B. subtilis* ВКПМ В-10641, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643.

#### Литература

1. Gueimonde M. Antibiotic resistance in probiotic bacteria // Front. Microbiol. 2013. V. 4. №. 202.
2. Захаренко С.М. Современные подходы к профилактике антибиотикассоциированной супрессии микрофлоры желудочно-кишечного тракта // Лечащий врач. 2010. № 11.
3. Ahmed M.O., Baptiste K.E. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms

and perspectives of human and animal health // *Microb Drug Resist.* 2018. V. 24. №. 5.

4. Bacanlı M., Başaran N. Importance of antibiotic residues in animal food // *Food Chem Toxicol.* 2019. V. 125. P. 462–466.

5. Zoumpopoulou G. Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional greek dairy products regarding specific strain-host interactions // *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018. V. 10. P. 313–322.

6. Grant A., Gay C.G., Lillehoj H.S. *Bacillus* spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry // *Avian Pathol.* 2018. V. 47. P. 339–351.

7. Ramlucken U. A novel *Bacillus* based multi-strain probiotic improves growth performance and intestinal properties of *Clostridium perfringens* challenged broilers // *Poult Sci.* 2020. V. 1. P. 331–342.

8. Adhikari B. Evaluation of the antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Bacillus*-DFM (Norum™) in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis /

B. Adhikari, D. Hernandez-Patlan, B. Solis-Cruz et al. // *Front Vet Sci.* 2019. V. 27. №. 282.

9. Hill C. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill, F. Guarner, G. Reid et al // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014. V. 11. P. 506–514.

10. Сизенцов А.Н., Ильясова Р.В. Эффективность совместного применения пробиотиков и антибиотиков в условиях *in vitro* // *Вестник Оренбургского государственного университета.* 2011. № 12 (131). С. 355–357.

11. Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. Морфологическое обоснование эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллёза крыс // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* 2011. № 1 (29). С. 192–195.

12. Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. Оценка эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллёза на основании исследования показателей крови // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* 2011. № 2 (30). С. 249–253.

**Мария Сергеевна Мирошникова**, магистрант, лаборант-исследователь. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет». Россия, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13; ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук». Россия, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, marymiroshnikova@mail.ru

**Maria S. Miroshnikova**, Master's degree student, laboratory assistant-researcher. Orenburg State University. 13, Victory Ave., Orenburg, 460018, Russia; Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences. 29, January 9 St., Orenburg, 460000, Russia, marymiroshnikova@mail.ru