

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ И ПРОБИОТИКОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Сизенцов А.Н.¹, Карпова Г.В.¹, Володченко В.Ф.¹, Тимофеева А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: asizen@mail.ru

В статье представлены данные по изучению эффективности совместного применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* с антибиотиком в отношении *S. enteritidis*. В ходе проведения экспериментов *in vitro* были установлены родовая устойчивость бактерий рода *Bacillus* к цефтазидиму, азтреонаму, колистину и видовая устойчивость *B. cereus* к пенициллину, *B. subtilis* 534 к хлорамфениколу; *B. licheniformis* ВКПМ В 7048 и *B. subtilis* ВКПМ В 7038 к цефотаксиму. При определении антибиотикопроductивности было установлено, что наибольшая выработка антибиотикоподобных веществ происходит на третьи сутки культивирования исследуемых штаммов микроорганизмов. В ходе определения аддитивного эффекта исследуемых пробиотических штаммов с антибиотиками установлено, что в отношении возбудителя сальмонеллезной инфекции эффективными являются комплексы *B. subtilis* 534 с пенициллином, а также *B. licheniformis* ВКПМ В 7048 и *B. subtilis* ВКПМ В 7038 с цефотаксимом, *B. cereus* с пенициллином.

Ключевые слова: *Bacillus*, антибиотики, Споробактерин, Бактисубтил, Ветом, аддитивный эффект.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF JOINT APPLICATION OF ANTIBIOTICS AND PROBIOTICS IN VITRO

Sizentsov A.N.¹, Karpova G.V.¹, Volodchenko, V.F.¹, Timofeeva A.A.¹

¹FGBOU IN "The Orenburg state university", Orenburg, e-mail: asizen@mail.ru

The article presents data on studying of efficiency of application of probiotic preparations on basis of bacteria of the genus *Bacillus* with antibiotic against *S. enteritidis*. During *in vitro* experiments it was established the generic resistance of bacteria of the genus *Bacillus* to ceftazidime, aztreonam, colistin and species *B. cereus* resistant to penicillin, *B. subtilis* 534 to chloramphenicol; *B. licheniformis* 7048 and *B. subtilis* 7038 to Cefotaxime. In determining antibioticproduction it was found that the largest generation of antibiotikoterapii substances takes place on the third day of cultivation of the studied strains of microorganisms. In the course of determining the additive effect of the studied probiotic strains with antibiotics found that against the causative agent Salmonella infection effective are the complexes of *B. subtilis* 534 penicillin, and *B. licheniformis* 7048 and *B. subtilis* 7038 with Cefotaxime, *B. cereus* penicillin.

Keywords: *Bacillus*, antibiotic, Sporobakterin, Baktisubtil, Vetom, additive effect

Микробиоценоз пищеварительного тракта человека составляет более 500 видов микроорганизмов, при этом их количество в различных отделах желудочно-кишечного тракта неодинаково и варьирует в широком диапазоне. Наиболее многочисленными представителями нормофлоры кишечника являются *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *E. coli*, *Bacterioides sp.*, *Clostridium sp.*, анаэробные стрептококки и другие микроорганизмы. Микрофлора ЖКТ участвует в процессах переваривания и всасывания, обеспечивает трофику кишечника, синтез витаминов, антиинфекционную защиту [1; 7].

Экзогенные и эндогенные факторы могут оказывать существенное влияние на качественный состав кишечной нормофлоры, что в свою очередь не только нарушает течение физиологических процессов, но и способствует развитию тяжелых патологических состояний. Количественное и качественное изменение состава кишечной нормофлоры называют дисбактериозом кишечника. Наиболее распространенной причиной развития

дисбактериоза является антимикробная химиотерапия, оказывающая прямое антагонистическое действие на представителей нормофлоры и существенно изменяющая «микробный пейзаж» пищеварительного тракта. В связи с этим при лечении антибиотиками и другими антимикробными препаратами рационально назначение пробиотических лекарственных средств во время проведения антибактериальной химиотерапии.

Успехом комплексного применения антибиотика и пробиотика является субэффективная концентрация антимикробного препарата в пищеварительном тракте и определенная резистентность пробиотического штамма к АМП. Пероральный прием антимикробного препарата дает возможность использования временного интервала, что в свою очередь позволяет назначать пробиотический препарат после снижения концентрации антибиотика в просвете кишечника до минимальных значений. Помимо этого, возможно использование сведений о резистентности пробиотических штаммов к АМП [2; 4; 6].

Также необходимо учитывать, что эффективность комплексной терапии повышается в том случае, если и пробиотический штамм и антибиотик являются синергистами, так как их совместное действие снижает частоту появления побочных эффектов этиотропной терапии и повышает эффективность эрадикационной. Таким образом, совместное применение антибиотиков и пробиотиков позволит снизить риск развития дисбактериоза или уменьшить его тяжесть.

Исходя из выше перечисленного перед нами была поставлена следующая цель исследования: определение эффективности совместного применения пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* с антибиотиками.

Объектами наших исследований являлись чистые культуры пробиотических штаммов микроорганизмов: *Bacillus subtilis* 534 (из биопрепарата «Споробактерин»), *Bacillus cereus* IP 5832 (из биопрепарата «Бактисубтил»), а также были получены отдельные чистые культуры *Bacillus subtilis* ВКПМ В 7038 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В 7048, входящие в состав «Ветом 2».

Для определения антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотиков, нами использовались следующие методы: метод определения антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus* с применением тест-систем Bio Merieux; диско-диффузионный метод (ДДМ) определения антибиотикорезистентности; метод последовательных разведений [5].

Для определения антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотиков, нами использовались следующие методы: метод определения антибиотикопродуктивности микроорганизмов на твердых питательных средах (метод

агаровых блочков); метод определения антибиотикопродуктивности микроорганизмов при культивировании их в жидких питательных средах (метод с агаровыми лунками) [5].

Оценку эффективности совместного применения антибиотиков и пробиотиков определяли по следующей схеме (рисунок 1).

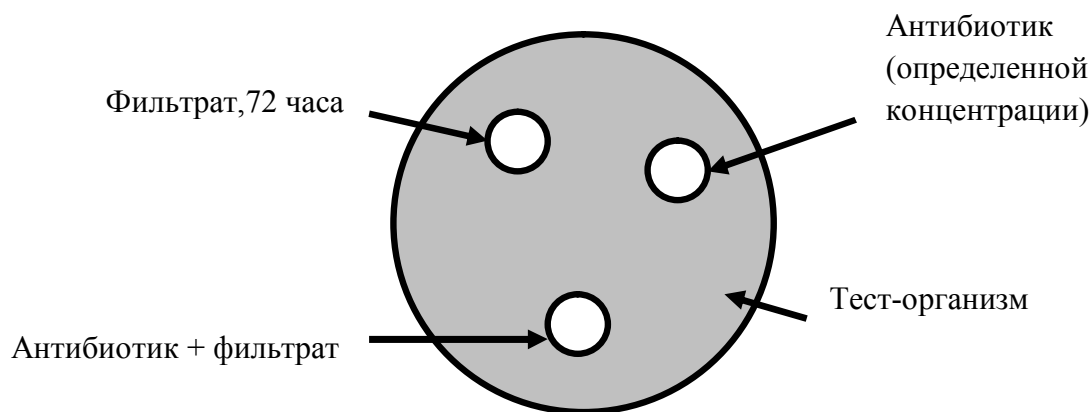


Рис. 1. Схема определения влияния антибиотика и пробиотика на подавление тест-организма в отдельности и совместно

Чашки Петри с МПА засеяли сплошным «газоном» тест-организмами (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*). Затем с помощью пробойника сделали три лунки (диаметр 6 мм) и внесли: в первую 30 мкл фильтрата, инкубированного 72 часа + 30 мкл физраствора, во вторую – 30 мкл антибиотика определенной концентрации, к которому условно-патогенные микроорганизмы оказались умеренно чувствительными + 30 мкл питательного бульона, а бактерии рода *Bacillus* – устойчивы, а в третью лунку – 30 мкл фильтрата + 30 мкл антибиотика, для того чтобы определить их влияние друг на друга.

Первоначальным этапом нашего исследования было определение антибиотикорезистентности пробиотических препаратов («Споробактерин», «Бактисубтил», «Ветом 2») на основе бактерий рода *Bacillus* с применением тест-систем Bio Merieux и ДДМ.

Критерием отбора антибиотиков для ДДМ, к которым исследуемые штаммы микроорганизмов проявляли резистентность, послужило определение антибиотикочувствительности с использованием тест-систем Bio Merieux, чтобы отобрать антибиотики, к которым бактерии рода *Bacillus* устойчивы, а тест-организмы – умеренно чувствительны. В соответствии с данным методом было установлено, что все четыре штамма бактерий рода *Bacillus* оказались устойчивы к пенициллину, оксациллину, тикарциллину, мецилинару, цефуроксиму, цефтазидиму, цефлулодину, цефиксиму, цефотаксиму, имипенему, линкомицину, хлорамфениколу, азтреонаму и колистину.

S. enteritidis оказалась умеренно чувствительна к пенициллину, ко всем антибиотикам из группы аминогликозидов, к цефуроксиму, цефокситину, цефоперазону, цефиксиму, цефотаксиму и хлорамфениколу.

На следующем этапе антибиотикорезистентность проверяли ДДМ с использованием стандартных дисков, содержащих антибиотики (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная таблица по антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотиков, с применением ДДМ (мм)

Антибиотики	Исследуемые тест-организмы				
	<i>B. subtilis</i> 534	<i>B. cereus</i> 5832	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7048	<i>B. subtilis</i> 7038	<i>S. enteritidis</i>
1	2	3	4	5	8
Penicilline	25,0±0,58	R	R	21,7±0,33**	20,7±0,67**
Ampicilline	26,0±0,58	17,7±0,33***	30,7±0,67	24,3±0,33*	25,7±0,67
Oxacilline	30,3±0,33	14,7±0,33***	26,0±0,58**	22,0±0,58***	R
Streptomycine	25,3±0,33	34,0±0,58	32,0±0,58	32,0±0,58	18,3±0,33***
Kanamycine	27,0±0,58	20,7±0,67**	25,0±0,58	25,0±0,58	22,0±0,58**
Gentamicine	35,0±0,58	30,3±0,88*	29,7±0,33**	29,3±0,33**	23,7±0,33***
Netilmicine	33,3±0,33	34,0±0,58	26,0±0,58***	32,3±0,88	21,3±0,67***
Cefalexine	35,0±0,58	29,7±0,33**	29,7±0,33**	32,3±0,67*	29,3±0,33**
Cefotaxime	36,3±0,67	20,0±0,58***	R	R	12±0,33***
Cefasoline	30,7±0,67	32,7±0,33	32,3±0,33	30,3±0,88	32,0±1,00
Cefixime	20,0±0,58	R	R	15,0±0,58**	29±1.76
Меропенем	34,0±0,58	32,0±0,58	29,3±0,67	35,3±0,33	30,0±0,58**
Imipeneme	45,7±0,67	38,0±1,15**	41,3±0,67*	41,0±0,58**	22,0±0,58***
Aztreonam	R	R	R	R	R
Vancomycine	21,3±0,88	17,7±0,33*	18,7±0,67	16,7±0,67*	22,7±0,33
Tetracycline	25,3±0,33	21,3±0,33**	22,7±0,33**	26,3±0,33	22,0±1,15*
Lincomycine	20,0±0,58	18,0±0,58	21,0±0,58	25,7±0,67	13,3±0,67**
Clindomycine	26,7±0,67	29,3±0,67	27,0±0,58	28,0±0,58	R
Erythromycine	33,0±0,58	28,3±0,88*	26,0±0,58**	30,3±0,33*	R
Chlorampheni- kol	R	22±0,91	24±0,58	27±0,17	13±0,21
Colistine	R	R	R	R	16,7±0,67

R – устойчивость к антибиотикам; * P < 0,050; ** P < 0,010; *** P < 0,001.

По результатам ДДМ *B. licheniformis* 7048 и *B. subtilis* 7038 оказались устойчивыми к цефотаксиму, азтреонаму, а *B. cereus* и *B. licheniformis* еще и к пенициллину, а *B. subtilis* 534 устойчив к хлорамфениколу. Все четыре штамма бактерии рода *Bacillus* проявили чувствительность к аминогликозидам, тетрациклинам, линкозамидам, макролидам. Полученные результаты полностью соответствуют результатам, полученным Дроздовой Е.А. и Щербаковой Н.В. при изучении резистентности пробиотических штаммов микроорганизмов к антибиотикам [3].

Наиболее устойчивым является штамм *B. cereus* 5832, поскольку дает наименьшие зоны подавления антибиотиками, а *B. subtilis* 534 более чувствителен к антибиотикам, так как для него характерны наибольшие зоны подавления роста. *S. enteritidis* как тест-организм является устойчивой ко многим антибиотикам.

Исходя из проведенных предварительных исследований нами были отобраны те антибиотики, к которым бактерии рода *Bacillus* оказались устойчивыми (Пенициллин и «Бактисубтил»; Цефотаксим и «Ветом 2» Хлорамфеникол и «Споробактерин»), а *S. enteritidis* умеренно чувствительна.

Следующим этапом было определение минимально подавляющих концентраций (МПК) изучаемых антибиотиков на рост исследуемых микроорганизмов. С этой целью мы использовали метод последовательных разведений (табл. 2).

Таблица 2

Определение МПК пенициллина, цефотаксима, хлорамфеникола методом последовательных разведений

Исследуемые объекты	Антибиотик	Разведение антибиотиков									
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Концентрация, ЕД		1 млн	500 тыс.	250 тыс.	125 тыс.	62,5 тыс.	31,25 тыс.	15,63 тыс.	7,81 тыс.	3,9 тыс.	1,95 тыс.
<i>B. cereus</i>	Пенициллин	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Концентрация, г		5	2,5	1,25	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7048	Цефотаксим	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> 7038		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. subtilis</i> 534	Хлорамфеникол	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Анализ ряда разведений растворов антибиотиков позволил определить концентрации, которые оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на исследуемые микроорганизмы, а также концентрации, которые не оказывают влияния на рост.

Для решения второй задачи нами проводились исследования по изучению антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus*, в ходе которых была выявлена их антагонистическая активность относительно тест-организмов.

В первую очередь мы попытались определить, на какие сутки происходит наибольшая выработка антибиотикоподобных веществ в питательную среду. Для этого мы использовали метод с агаровыми лунками. Бактерии рода *Bacillus* выращивали в питательном бульоне в течение 48, 72 и 96 часов. В дальнейшем опыте использовали фильтрат от бактерий, по результатам которого установили, что максимальная выработка антибиотикоподобных веществ осуществляется через 72 часа культивирования микроорганизма. Это можно объяснить ростом популяции бактерий и конкуренцией за питательные компоненты среды.

Изначально антибиотикопродуктивность бактерий рода *Bacillus* изучили при их культивировании на твердых питательных средах с использованием метода агаровых блочков (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная таблица по антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* методом агаровых блочков

Название штамма	<i>B.subtillis</i> 534	<i>B.cereus</i> IP 5832	<i>B.licheniformis</i> ВКПМ В 7048	<i>B.subtillis</i> ВКПМ В 7038
<i>S. enteritidis</i>	26,0±0,58	22,7±0,33	23,3±0,33	24,3±0,67

Дальнейшие исследования по определению антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* проводили при культивировании на жидких питательных средах методом агаровых лунок и методом наложения дисков, пропитанных антибиотиками. Данные по зонам подавления тест-организма *Salmonella enteritidis* методом агаровых лунок представлены в табл. 4.

Таблица 4

Сравнительный анализ антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* методом агаровых лунок

Название штамма	<i>B.subtillis</i> 534	<i>B.cereus</i> IP 5832	<i>B.licheniformis</i> ВКПМ В 7048	<i>B.subtillis</i> ВКПМ В 7038
<i>S. enteritidis</i>	11,0±0,58	8,7±0,33	10,3±0,33	9,3±0,67

Анализ экспериментальных данных (табл. 4) свидетельствует о том, что выраженной антагонистической активностью в отношении тест-организмов обладает штамм *B. subtillis*

534, а наименее выраженной - *B. cereus*. Зона подавления роста тест-организмов находится в прямой зависимости от концентрации вырабатываемых антибиотических соединений бактериями рода *Bacillus*. При применении метода с наложением дисков также были получены диаметры зон подавления роста тест-организмов, были получены аналогичные результаты.

Эффективность совместного использования антибиотиков и пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*. В этом случае можно установить явление синергизма (или аддитивность), когда происходит суммация антагонистического действия антибиотиков и пробиотиков, что имеет большую практическую значимость. Также можно зарегистрировать либо негативный эффект (антагонизм), когда антибиотикоподобные вещества, вырабатываемые бактериями, могут блокировать мишени действия антибиотиков, либо отсутствие какого-либо эффекта.

В связи с этим, учитывая результаты определения антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus* к антибиотикам, мы провели опыт по изучению эффективности совместного действия антибиотических препаратов и пробиотических штаммов на условно-патогенные микроорганизмы (рис. 2).

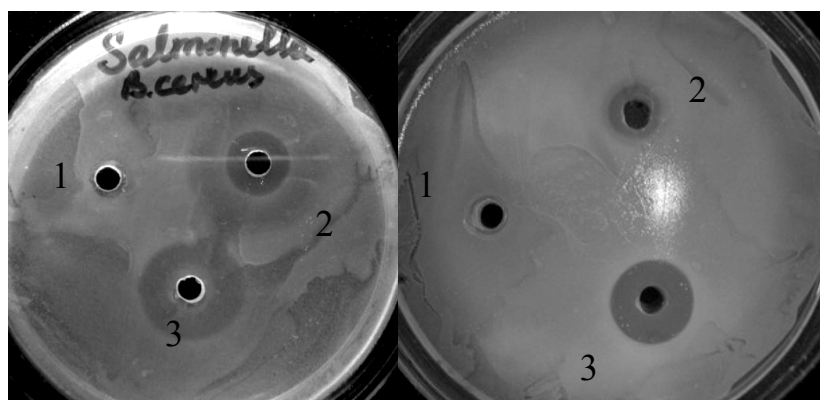


Рис. 2. Метод по совместному применению антибиотика и пробиотика на основе бактерий рода *Bacillus*: 1 – фильтрат, 2 – антибиотик, 3 – антибиотик + фильтрат

На рис. 2 показан результат совместного применения антибиотика цеффиксима (левый рисунок) и *B. cereus* при подавлении *Salmonella enteritidis*, пенициллина (правый рисунок) и *B. licheniformis* ВКПМ В 7048 при действии на *Salmonella enteritidis*.

Далее представлена обобщающая табл. 5 по эффективности совместного применения антибиотиков и пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*.

Представленные в табл. 5 данные позволяют нам выделить пару антибиотик и пробиотик, которая подавляет тест-организм *Salmonella enteritidis in vitro* и, следовательно, дальнейшее использование этой пары *in vivo* при лечении сальмонеллеза.

Экспериментальная оценка эффективности комплексного применения антибиотиков и пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*

Штамм	<i>Salmonella enteritidis</i>		
	Пенициллин	Цефотаксим	Хлорамфеникол
<i>B. subtilis</i> 534	Н	Н	А
<i>B. cereus</i> IP 5832	А	Н	О
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7048	А	А	Н
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В 7038	Н	А	О
Примечание: А – аддитивный эффект, Н – негативный эффект, О – отсутствие эффекта			

Список литературы

1. Бондаренко В.М. Механизм действия пробиотических препаратов / В.М. Бондаренко, Р.П. Чуприна, М.А. Воробьева // БИОпрепараты. – 2003. – № 3. – С. 2-5.
2. Воробьев А.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции / А.А. Воробьев, Е.А. Лыкова // Микробиология. – 2001. – № 6. – С. 102-105.
3. Дроздова Е.А. Резистентность пробиотических штаммов микроорганизмов к антибиотикам / Е.А. Дроздова, Н.В. Щербакова // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 3 (66). – С. 25-27.
4. Захаренко С.М. Антибиотики, пробиотики, пребиотики: друзья или враги? / С.М. Захаренко, А.Н. Суворов // Consilium Medicum. – 2009. – № 8. – С. 21-29.
5. Сизенцов А.Н. Методы определения антибиотикопродуктивности и антибиотикорезистентности. Методические указания к лабораторному практикуму. – Оренбург, 2009. – 107 с.
6. Ellermeier C.D. A Three-protein Signaling Pathway Governing Immunity to a bacterial cannibalism toxin / C.D. Ellermeier, E.C. Hobbs, J.E. Gonzalez-Pastor, R. Losick // Cell. – 2006. – V. 124. – № 10. – P. 549-559.
7. Saarela M. Gut bacteria and Health foods-the European perspective / M. Saarela, S. Crittenden, N. Salminen, T. Mattila-Sandholm // International J. Food Microbiology. – 2002. – V. 78. – № 5. – P. 99-117.