

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 636.087.8:579

Н. М. Аль-Хаммаш, аспирант (БГТУ);
А. В. Игнатенко, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)

АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ *E. coli*

Статья посвящена проблеме антибиотикорезистентности микроорганизмов на молочно-товарных комплексах (МТК). Цель работы – анализ резистентности микроорганизмов *E. coli* к антибиотикам, используемым на МТК. В результате проведенной работы установлен спектр устойчивости колиформ к используемым антибиотикам на МТК «Заболоть» Гродненского района. Показано, что выделенные штаммы микроорганизмов *E. coli* проявляют высокую резистентность к антибиотикам: олететрину, эритромицину, полимиксину, бензилпенициллину. Клетки *E. coli* сохраняли высокую чувствительность к цефтриаксону, фурадонину, канамицину, сизомицину, гентамицину. Это позволяет рекомендовать данные антибиотики для лечения колибактериоза животных на МТК.

The article deals with the problem of microorganisms resistance to antibiotics at dairy farms. The purpose of the work is analysis of *E. coli* resistance to antibiotics used at dairy complexes. In the result of field work it was cleared up the range of coliforms stability to antibiotics at dairy complex “Zabolot” Grodno region. It was shown that selected strains of microorganisms *E. coli* exhibit a high resistance to antibiotics: oletetrin, erythromycin, polymyxin, benzylpenicillin. Cells of *E. coli* remained high sensitivity to ceftriaxon, sisomicin, furadonin, kanamycin, gentamicin that allows to recommend these antibiotics for animals treatment.

Введение. Повышение антибиотикорезистентности микроорганизмов является одной из актуальных и нерешенных проблем борьбы с патогенными микроорганизмами.

Причина этого явления связана с длительным использованием одних и тех же препаратов в медицине и ветеринарии при лечении человека и животных и обусловлена быстрой адаптируемостью микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Рост резистентности микроорганизмов к антибиотикам впервые был обнаружен в медицине, позже – в ветеринарии, а затем это явление было установлено и для других антимикробных веществ [1–5].

В начале проблему пытались решить путем поиска и синтеза новых антимикробных препаратов, однако в настоящее время стало ясно, что микроорганизмы адаптируются к ним быстрее, чем открываются новые антимикробные вещества. В настоящее время известно около 6000 антибиотиков. Путь от открытия, испытания до внедрения нового антибиотика даже на Западе занимает от 5 до 10 лет и обходится в несколько миллионов долларов.

В то же время микроорганизмам в лабораторных условиях достаточно несколько недель для адаптации к новому антимикробному препарату. В реальных условиях полная адаптация к новым антибиотикам наблюдается в течение 5 лет, частичная – в течение года и ранее [3]. В этой связи человечество проигрывает «гонку вооружений» в борьбе с микроорганизмами.

По данным FAO/ВОЗ, в медицине от резистентности микроорганизмов к антибиотикам ежегодно умирает 25 тыс. человек [5].

В ветеринарии проблема стоит еще острее. В молокопроизводстве из 5 лет запланированного срока применения животного из-за антибиотикорезистентности оно используется не более 3 лет, а далее миллионы животных не лечатся, а выбраковываются на мясо [1].

Пока не найдены новые более эффективные способы борьбы с антибиотикорезистентностью микроорганизмов, одним из основных путей решения данной проблемы является правильное использование антибиотиков, своевременное обнаружение повышения резистентности микроорганизмов и чередование применяемых препаратов.

Анализ резистентности микробиоты МТК является одной из актуальных задач обеспечения санитарно-гигиенических условий производства высококачественного молока.

В настоящее время на МТК контроль за антибиотикорезистентностью микроорганизмов не проводится из-за отсутствия необходимых средств и доступных методов анализа. Такую работу выполняют ветеринарные и микробиологические испытательные центры и исследовательские организации.

Основная часть. Цель работы – анализ резистентности микроорганизмов *E. coli* к антибиотикам, используемым на МТК.

Колибактериоз является одной из широко распространенных причин заболеваемости животных маститом [1].

Бактерии *E. coli* относятся к условно-патогенным микроорганизмам и служат основными санитарно-показательными микроорганизмами, используемыми для характеристики безопасности пищевой продукции. Они также отличаются высокой удельной скоростью роста и быстрой адаптируемостью к среде обитания [6].

Условно-патогенная микробиота является постоянным обитателем организма животных, накапливается в больших количествах в помещениях МТК и постоянно сопутствует патогенам, вызывающим заболевания.

Работа с патогенами затруднена из-за их низких концентраций и специальных условий работы с ними. В этой связи целесообразно проводить мониторинг устойчивости микроорганизмов к антибиотикам по условно-патогенной микробиоте, которую проще и легче выделять и контролировать.

Отбор образцов для исследования осуществляли на МТК «Заболоть» Гродненского района. Выделение, идентификацию микроорганизмов и анализ антибиотикорезистентности микробиоты проводили в лаборатории кафедры микробиологии и эпизоотологии ГГУ, а также на кафедре биотехнологии и биоэкологии БГТУ.

Выделение энтеробактерий осуществляли из тканей умерших животных в соответствии с [7]. Дифференциацию и идентификацию микроорганизмов *E. coli* проводили согласно существующей систематике, принятой подкомитетом кишечных бактерий номенклатурного комитета Международной ассоциации микробиологов, и определителем Берги, а также иммунологическим методом [6, 8].

Оценку резистентности микроорганизмов к антибиотикам проводили стандартным методом диффузии веществ в агар [9].

При определении чувствительности исследуемых бактериальных культур диско-диффузионным методом на поверхность агара в чашке Петри наносили 0,1 см³ бактериальной суспензии, эквивалентной стандарту мутности 0,5 по McFarland и затем помещали бумажные диски диаметром 6 мм, содержащие определенное количество антибиотиков, рекомендованных по инструкции применения препаратов.

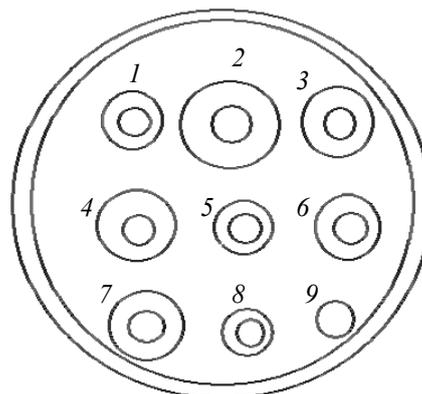
После инкубации чашек в течение суток в термостате при температуре 37°C измеряли диаметры зон подавления роста клеток вокруг дисков.

В качестве антибиотиков применяли препараты, широко используемые в ветеринарии для лечения животных: бензилпенициллин, тетрациклин, левомецетин, сизомицин, фурадонин, неомицин, канамицин, олететрин, эритромицин, полимиксин, карбенициллин, цефтриаксон, олеандомицин, клиндамицин, пefлоксацин, цефалексин, линкомицин, гентамицин, оксацилин, фузидин, ампициллин.

Рабочие концентрации антибиотиков готовили из продаваемых препаратов в соответствии с инструкциями к их употреблению.

В результате проведенной работы выделено 18 штаммов бактерий *E. coli* и изучена их устойчивость к антибиотикам методом диффузии веществ в агар.

На рисунке приведены результаты анализа чувствительности и резистентности отдельного штамма бактерий *E. coli* к ряду антибиотиков.



Анализ резистентности выделенных микроорганизмов *E. coli* методом диффузии антибиотиков в агар:

- 1 – бензилпенициллин; 2 – сизомицин; 3 – фурадонин;
4 – неомицин; 5 – полимиксин; 6 – тетрациклин;
7 – канамицин; 8 – эритромицин; 9 – олететрин

Антибиотикорезистентность микроорганизмов определялась по диаметру зон подавления их роста на агаризованной среде и оценивалась в соответствии с общепринятыми критериями (табл. 1).

Таблица 1

Критерии резистентности микроорганизмов

Разновидности микроорганизмов	Диаметр зоны подавления роста, мм	Дозы антибиотиков для терапии
Чувствительные	Более 12	Рекомендуемые
Средней резистентности	Менее 12	Максимально допустимые
Резистентные	Отсутствует	Не эффективны

Как следует из табл. 1 при диаметре зоны ингибирования роста более 12 мм микроорганизмы считаются чувствительными, менее 12 мм – средней резистентности, при отсутствии зоны подавления роста они относятся к устойчивым формам [9].

Приведенные на рисунке результаты указывают на то, что выделенный штамм микроорганизмов *E. coli* обладает высокой чувствительностью к сизомицину, фурадонину, неомицину, канамицину, средней чувствительностью к тетрациклину и проявляет высокую устойчивость к олететрину, эритромицину, полимиксину, бензилпенициллину.

Таблица 2

Анализ влияния антибиотиков на резистентность микроорганизмов *E. coli*

Антибиотики	Содержание форм, %		
	Чувствительные	Среднеустойчивые	Устойчивые
1. Фурадонин	72,2	27,8	0
2. Карбенициллин	16,7	16,6	66,7
3. Олететрин	0	0	100,0
4. Неомицин	38,9	55,5	56,0
5. Цефтриаксон	100,0	0	0
6. Бензилпенициллин	0	5,6	94,4
7. Олеандомицин	0	0	100,0
8. Канамицин	78,6	14,3	7,1
9. Клиндомицин	0	0	100,0
10. Пефлоксацин	62,5	0	37,5
11. Цефалексин	71,4	0	28,6
12. Сизомицин	88,9	11,1	0
13. Левомецитин	38,9	16,7	44,4
14. Полимиксин	16,7	50,0	33,3
15. Эритромицин	0	0	94,5
16. Линкомицин	5,5	0	94,5
17. Гентамицин	83,3	11,1	5,6
18. Оксацилин	0	0	100,0
19. Тетрациклин	11,1	5,6	83,3
20. Фузидин	11,1	0	88,9
21. Ампициллин	33,3	5,6	61,1

В табл. 2 приведены результаты анализа спектра резистентности 18 выделенных штаммов бактерий *E. coli* к изученным антибиотикам.

В результате сопоставления чувствительности клеток микроорганизмов к антибиотикам они были отнесены к группам чувствительных, средне чувствительных и резистентных форм и было определено их процентное содержание.

Как следует из табл. 2, все выделенные штаммы микроорганизмов проявляли резистентность к антибиотикам олететрину, олеандомицину, клиндомицину, оксацилину. Высокий процент устойчивых форм наблюдался для бензилпенициллина, эритромицина, линкомицина, фузидина, тетрациклина. Для препаратов цефтриаксон, фурадонин, сизомицин резистентных форм не было обнаружено.

Заключение. В работе проведен анализ антибиотикорезистентности бактерий *E. coli* к широкому спектру используемых на практике антибиотиков. Полученные результаты позволяют рекомендовать молочно-товарному комплексу замену неэффективных антибиотиков и более широкое применение таких препаратов, как цефтриаксон, фурадонин, канамицин, сизомицин, гентамицин для профилактики и лечения колибактериоза животных.

Литература

1. Богуш, А. А. Мастит коров и меры его профилактики / А. А. Богуш, В. Е. Иванов, Л. М. Бордич; рец. П. А. Красочко, М. В. Якубовс-

кий, Н. Ю. Щурова. – Минск: Белпринт, 2009. – 158 с.

2. Сидоренко, С. В. Происхождение, эволюция и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 12. – С. 19–22.

3. Amyes, S. B. Antibiotic resistance / S. B. Amyes, C. G. Gemmel // J. Med. Microbiol. – 1997. – Vol. 46, No. 6. – P. 436–470.

4. Hancock, R. E. The role of fundamental research and biotechnology in funding solutions to the global problem of antibiotic resistance / R. E. Hancock // Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 24, No. 1. – P. 148–150.

5. Борьба с устойчивостью к антибиотикам с позиций безопасности пищевых продуктов в Европе / под ред. Н. Kruse, F. Racioppi. – Рим: ВОЗ, 2011. – 80 с.

6. Инфекционные болезни и эпидемиология: учеб. для вузов / В. И. Покровский [и др.]. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 816 с.

7. Солонко, А. А. Практикум по микробиологии / А. А. Солонко, А. А. Гласкович, Ф. Е. Тимофеев. – Минск: Дизайн ПРО, 1998. – 192 с.

8. Иммунология: учеб. пособие / П. А. Красочко [и др.]; под ред. П. А. Красочко, Н. Д. Лисова. – Минск: Аверсэв, 2005. – 128 с.

9. Молоко и молочные продукты. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков: ГОСТ Р 51600–2010. – Введ. 01.01.2011. – М.: Стандартинформ, 2010. – 11 с.

Поступила 17.03.2012