

IRSTI: 68.41.35

R.Zh. MYKTYBAEVA^{1*}, Z.A. KOZHAKHMETOVA¹, Sh.A. ALPEISOV¹,
A.R. SANSYZBAI¹, Zh. M.OTEBAJEV¹, S. OZKAYA²

¹Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

²Applied Sciences University of Isparta, Isparta, Turkey

e-mail: raya_myktybayeva@mail.ru

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF NEW STRAINS OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM NATURAL SOURCES

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.16

Abstract

During the treatment of farm animals with various medicines, including antibiotics, quite often there is a suppression of the activity of beneficial microflora, which, in turn, causes an increase in the number of pathogenic and potentially dangerous to animal health microorganisms in the intestine. In this regard, the selection of different cultures of microorganisms in probiotic preparations is of great importance to such property as antibiotic resistance. In this article, the objects of the research were new strains of lactic acid bacteria isolated from natural sources, showing antibiotic resistance to the following antibiotics: benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin, carbenicillin.

Keywords: microorganisms, bacterial strains, resistance, antibiotics.

World experience shows that in the prevention and treatment of gastrointestinal diseases of young farm animals and birds, replacement therapy is of great importance, aimed at restoring intestinal biocenosis by regular administration of live bacteria - representatives of normal intestinal microflora [1].

In modern conditions, probiotic preparations containing live representatives of beneficial microorganisms are increasingly used to neutralise mycotoxins entering the digestive tract with feed. Probiotics can be introduced into feed in the form of lyophilised powders and in liquid form (they contain bifido-, propionic acid bacteria, *lactobacilli*, lactic acid streptococci and their combinations) in order to restore normal intestinal microflora, activate fermentolysis of feed nutrients, strengthen the immunity of the organism, increase the growth rate of young animals, etc. [2].

According to the regulated requirements, the term "probiotic" means a functional food ingredient in the form of beneficial for humans and animals, non-pathogenic and non-toxicogenic live microorganisms. Probiotics include mainly representatives of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, as well as certain strains of some species of *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* species [3,4].

It should be noted that antibiotics have a negative effect on the development of lactic acid bacteria. This occurs when antibiotics entering food raw materials during the treatment of farm animals can suppress the development of probiotic microflora during the technological process of food production, which worsens their quality and creates a potential danger for the development of extraneous antibiotic-resistant microflora. In case of irrational treatment of humans and farm animals with antibiotics, the activity of beneficial microflora is suppressed, causing an increase in the number of pathogenic and potentially dangerous for humans and farm animals microorganisms in the intestine. Therefore, the selection of microbial cultures for probiotic preparations and food products based on them is of great importance for such property as resistance to antibiotics.

It is known that the combined use of antibiotics and antibiotic-resistant strains of microorganisms contributes to the effective restoration of normal intestinal microflora already in the process of antibiotic therapy [5,6].

Antibiotic resistance of natural strains of *lactobacilli* and yeasts is a species property. At the

same time, antibiotic resistance of lactic acid bacteria can be the basis for the use of such strains for the production of new food products and therapeutic drugs, which will become the main means of combating pathogens of the gastrointestinal tract.

A number of researchers have studied the antibiotic resistance of *B.subtilis* strains to 14 antibiotics that are most commonly used in the clinic. As a result, it was found that *B.subtilis* strain 1719 was more resistant to gentamicin, polymyxin, and erythromycin, while *B.subtilis* strains 1594 and *B.subtilis* 1318 were resistant only to gentamicin [7].

Thus, the antimicrobial susceptibility study of a bacterial strain provided the basis for its approval as a probiotic. In a number of sources, the authors note that in cases of concomitant administration with antibiotics to prevent and treat intestinal disorders, probiotics must be resistant to certain antibiotics in order to survive in the gastrointestinal tract.

The antimicrobial properties of lactic acid bacteria have received special attention, as they have various advantages as agents against antibiotic-resistant pathogens.

Natural resistance to some antibiotics is characteristic of bifido and lactic acid bacteria. Strains with natural antibiotic resistance are considered suitable for use as probiotics [8].

Materials and methods of research

The objects for the research were strains of lactic acid bacteria from the genus *Lactobacillus* 7K-2L, 7K-6L, 5K-9L1, 7K-16L, 17K-6L12 isolated from natural sources. To study antibiotic resistance of *lactobacilli*, we used the well-known disk-diffusion technique with standard antibiotic disks impregnated with standard solutions of benzylpenicillin, tetracycline, kanamycin, streptomycin, levomycetin, polymyxin and erythromycin.

Agar with hydrolyzed milk (AHM) and MRS-1 was used as nutrient medium for lactic acid bacteria. For this purpose, melted agarized nutrient medium was poured into sterile Petri dishes, and after cooling it was dried in the thermostat. On the surface of the solidified nutrient medium was applied one-day culture grown at optimal temperature in the form of cell suspension in the amount of 1 ml, 1 mlrd of suspension of the tested strain, and evenly distributed over the entire surface of the medium with a Drigalsky spatula. Excess liquid was removed, then the cultures were dried in the thermostat for 30 minutes. After that, antibiotic disks were placed on the surface of the seeded medium with sterile tweezers at an equal distance from each other and at a distance of 2 cm from the edge of the cup. Petri dishes with disks and antibiotics were incubated for 2-3 hours at room temperature (for temporary inhibition of culture growth and diffusion of antibiotics into the agar thickness), and then in the thermostat at +40°C until visible growth of cultures. To avoid smearing of the zones with condensation water, the cups were placed upside down in the thermostat.

Russian disks (Pharmacotherapy Research Center) for determining sensitivity to antimicrobials were used during the research process.

The results obtained were evaluated according to the instructions for determining the sensitivity of microbes to antibiotics using the paper disc method, i.e., insensitive strains were characterised by growth around the paper disc; insensitive strains were characterised by a zone with a diameter of up to 15 mm; sensitive strains were characterised by a zone with a diameter of 15 to 25 mm; and highly sensitive strains were characterised by a zone with a diameter of more than 25 mm [16].

Results and discussion

The degree of sensitivity of isolated new strains of lactic acid bacteria to antibiotics is an important factor, as the development of gastrointestinal microflora or microorganisms included in probiotics is suppressed during antibiotic treatment of young farm animals and birds. Antibiotic resistance of newly isolated strains of *lactobacilli* was determined by disc-diffusion method, measuring the diameters of growth retardation zones. The sample of 5 strains of *lactobacilli*, 3 were resistant to 8 antibiotics: benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenicillin. All strains of lactic acid bacteria tested were sensitive to tetracycline and levomycetin. *Lactobacillus* strain 7K-16L is resistant to streptomycin, polymyxin, kanamycin, nystatin, weakly sensitive to benzylpenicillin, azithromycin, tetracycline,

ampicillin and carbenil, sensitive to levomycetin. *Lactobacillus* strain 17K-6L12 showed resistance to benzylpenicillin, nystatin, ampicillin, carbenicillin, weak sensitivity to levomycetin, polymyxin, kanamycin, sensitivity to streptomycin, azithromycin and tetracycline. It should be noted that the above results of our studies are in agreement with the data of Cano Roca [9]. Also, all the studied strains of *lactobacilli* were resistant to benzylpenicillin, which was noted in the works conducted by other researchers [10-14].

In her research Kitaevskaya S.V. [15] notes high sensitivity of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacterium* to benzylpenicillin. In our research, isolated new strains of lactic acid bacteria were also resistant to benzylpenicillin.

The results obtained in the research are summarised in Table.

Table - Antibiotic resistance results of newly isolated *Lactobacillus* strains

Strains	Antibiotics									
	Benzylpenicillin	streptomycin	levomycetin	polymyxin	kanamycin	azithromycin	nystatin	tetracycline	ampicillin	carbenicillin
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
7K-2L	6±0,1	6±0,1	15±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
7K-6L	6±0,1	6±0,1	15±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
5K-9L1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
7K-16L	6±0,1	6±0,1	20±0,2	6±0,2	6±0,1	15±0,2	6±0,1	15±0,2	13±0,2	13±0,2
17K-6L12	6±0,1	20±0,2	15±0,2	13±0,2	13±0,2	20±0,2	6±0,1	23±0,2	6±0,1	6±0,1

The table shows that the isolated new *Lactobacillus* strain 7K-2L was resistant to benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenicillin, weakly sensitive to tetracycline, levomycin, (zone of growth suppression of the strain 13-15 mm). *Lactobacillus* strain 7K-6L were resistant to benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenicillin, weakly sensitive to tetracycline, levomycin, (strain growth suppression zone 13-15 mm). *Lactobacillus* strain 5K-9L1 were resistant to benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenil, weakly sensitive to tetracycline, levomycin, (strain growth suppression zone 13-15 mm). *Lactobacillus* strain 7K-16L is resistant to streptomycin, polymyxin, kanamycin, nystatin, weakly sensitive to benzylpenicillin, azithromycin, tetracycline, ampicillin and carbenicillin (zone of growth suppression of the strain 10-15 mm), sensitive to levomycetin (zone of growth suppression of the strain 20 mm). *Lactobacillus* strain 17K-6L12 showed resistance to benzylpenicillin, nystatin, ampicillin, and carbenicillin, weak sensitivity to levomycetin, polymyxin, and kanamycin (strain growth suppression zone 13-15 mm), sensitivity to streptomycin, azithromycin, and tetracycline (strain growth suppression zone 20-23 mm).

Figures 1 and 2 show the antibiotic resistance of newly isolated strains of *lactobacilli* researched by disk-diffusion method.

The analysis of the figures showed that the growth of *lactobacilli* strains 7K-2L, 7K-6L, 5K-9L1 around disks with antibiotics indicates their resistance to benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenicillin. Strains 7K-2L, 7K-6L, 5K-9L1 and 7K-16L showed weak sensitivity to levomycin and tetracycline, while strain 17K-6L12 was sensitive to these antibiotics. The formation of light zones around the disks with streptomycin, levomycetin, polymyxin, kanamycin, azithromycin and tetracycline indicates the sensitivity of *lactobacilli* to these antibiotics.

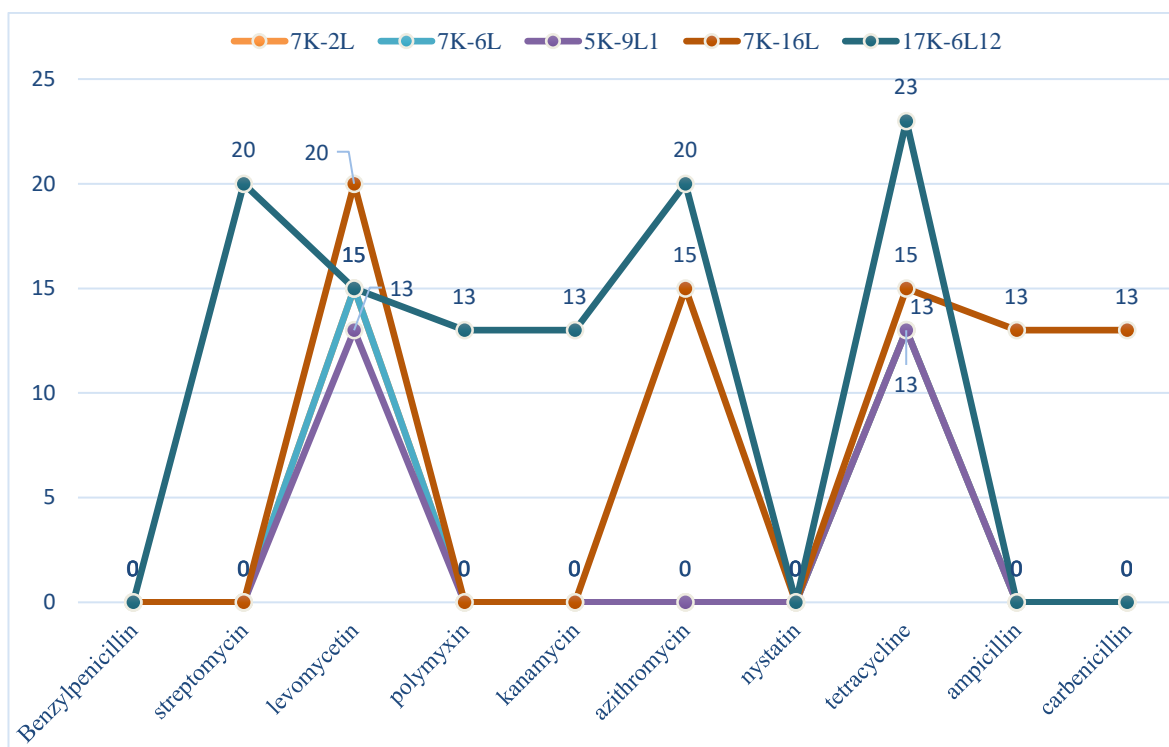


Figure 1 - Antibiotic resistance chart of newly isolated Lactobacillus strains

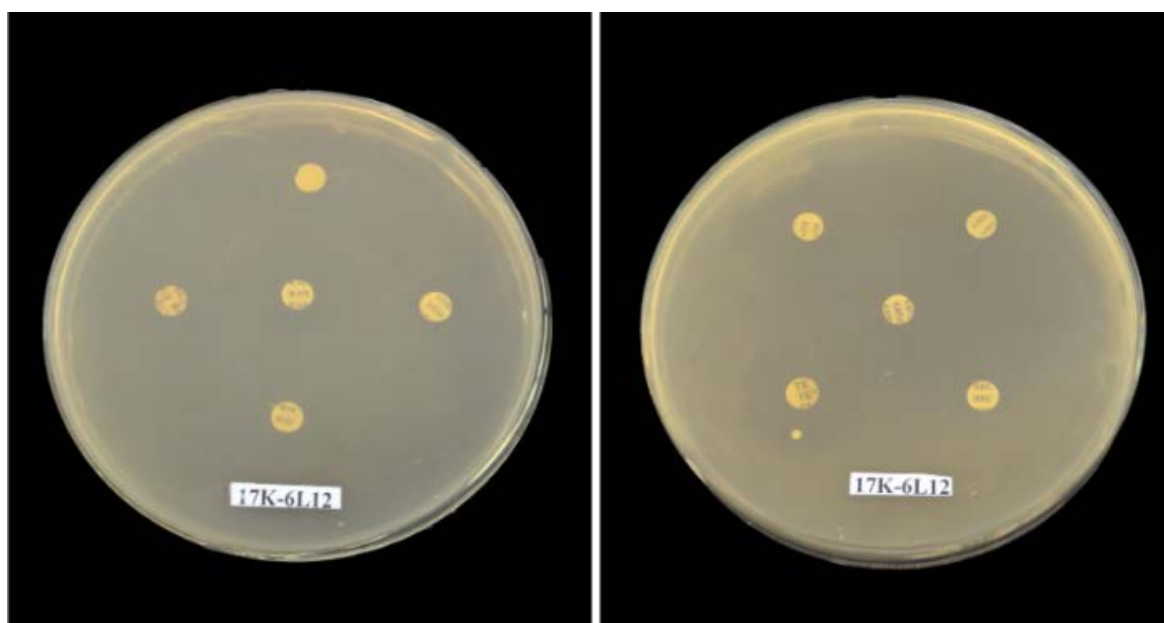


Figure 2 - Antibiotic resistance of newly isolated strains of Lactobacillus examined by the disk-diffusion method

Therefore, based on the obtained results of the research, it can be stated that the following strains of *lactobacilli* 7K-2L, 7K-6L, 5K-9L1 showed high resistance to benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin and carbenicillin.

Lactic acid bacteria may harbor antibiotic resistance genes and participate in the transmission of these genes to other microorganisms. There is evidence in the literature that genes encoding resistance to tetracyclines and erythromycin are most often transmitted [17, 18].

Natural resistance to some antibiotics is characteristic of bifidobacteria and lactic acid bacteria. Strains with natural resistance to antibiotics are considered suitable for use as probiotics and starter cultures for fermented milk products [19].

The degree of sensitivity of lactic acid bacteria to antibiotics is an important aspect, especially in the context of their use in veterinary medicine. Studying the sensitivity of isolated new strains of lactic acid bacteria to antibiotics is of great importance to ensure the safety and effectiveness of their use as probiotics.

Based on the studies conducted, it was established that the studied strains are relatively resistant to antibiotics and can be recommended for use as part of a probiotic preparation to improve the immune status, as well as normalize the microbiota of the gastrointestinal tract of farm animals.

Conclusion

The obtained research results allow us to conclude that strains of *Lactobacilli* isolated from fermented milk products of different geographical zones can serve as a source of therapeutic and prophylactic preparations of a new generation.

The sensitivity of lactic acid bacteria to antibiotics is an important issue not only in cases where microorganisms are pathogenic and cause infections, but also for understanding changes in the normal intestinal flora when antibiotics are prescribed and when selecting a *Lactobacillus* strain as a probiotic.

Consequently, the research of resistance of newly isolated strains of *Lactobacilli* to 8 antibiotics of different classes (benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin, carbenicillin) characterizes the safety of the target strains considered as potential probiotics.

Of the selected 5 strains of *Lactobacilli*, 3 strains were resistant to 8 antibiotics: benzylpenicillin, streptomycin, polymyxin, kanamycin, azithromycin, nystatin, ampicillin, and carbenicillin. In general, all *Lactobacilli* strains tested were sensitive to tetracycline and levomycetin, and 2 of them showed weak sensitivity to azithromycin, tetracycline, ampicillin, and carbenicillin.

Funding

The research was carried out within the framework of the Grant funding of the Committee of Science of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (AP19677719).

References:

- 1 Sidorenko O. D., Har'kova A. P. Antibiotikochuvstvitelnost otdel'nyh shtammov laktobakterij i drozhzhej kislomolochnyh produktov razlichnyh geograficheskikh zon, *Izvestija Timirjazevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii*, 2014, 2: 148-153. (https://scholar.google.com/Antibiotikochuvstvitel#nost#otdel'nyh_shtammov_laktobakterij_i_drozhzhej_kislomolochnyh_produktov_razlichnyh_geograficheskikh_zon)
- 2 Selvin J, Maity D, Sajayan A, Kiran GS. Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 9: 22:202-205. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.007>)
- 3 Shenderov B.A. *Funkcional'noe pitanie i ego rol'*. M.: Deli Print, 2008. (https://books.google.kz/books/about/Funkcional'noe_pitan.html?id=DpY6OQAACAAJ&redir_esc=y)
- 4 Bernhom N., Licht T.R., Brogren C.H. et al. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72: 1239-1244. (doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.1239-244.2006>)
- 5 Artjuhova S. I., Moliboga E. A. Izuchenie prirodnoj ustojchivosti mikroorganizmov polikomponentnoj zakvaski molochnyh produktov k antibiotikam, *Voprosy pitaniya*, 2005, 74(6): 34-36. (https://scholar.google.com/Izuchenie_prirodnoj_ustojchivosti_mikroorganizmov_polikomponentnoj_zakvaski_molochnyh_produktov_k_antibiotikam)
- 6 Vinogradskaja S. E. i dr. Izuchenie chuvstvitel'nosti molochnokislyh kul'tur i mikroflory kislomolochnyh produktov k antibiotikam, *Sbornik nauchnyh trudov SevKavGTU. Serija Prodovol'stvie*, 2005, 1: 19-23. (https://scholar.google.com/Izuchenie_chuvstvitel'nosti_molochnokislyh_kul'tur_i_mikroflory_kislomolochnyh_produktov_k_antibiotikam)

7 Gataullin A. G. *Biologicheskie svoystva shtammov Vacillus subtilis perspektivnykh dlja sozdaniya novykh probiotikov. Avtoreferat dissertacii na soiskanie uchennoj stepeni kandidata biologicheskikh nauk.* Moskva, 2005. (<https://www.dissercat.com/content/biologicheskie-svoystva-shtammov-bacillus-subtilis-perspektivnykh-dlya-sozdaniya-novykh-prob>)

8 Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance. *The EFSAJ*, 2012, 10: 2740-2750. (doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>)

9 Cano Roca, Carmen Lucia *Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and Prebiotic Utilization.* Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology, 2014, 8: 46. (<https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/46/>)

10 Ammor, M.S., Belén Flórez A., Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 2007, 24(6): 559–570. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>)

11 Patel, A., Shah, N., & Prajapati, J.B. Antibiotic resistance profile of lactic acid bacteria and their implications in food chain. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2012, 7: 202–211. (doi: [http://idosi.org/wjdfs/wjdfs7\(2\)/14.pdf](http://idosi.org/wjdfs/wjdfs7(2)/14.pdf))

12 Morandi S., Silveti T., Miranda Lopez J.M., Brasca M. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *J. Food Saf.* 2015, 35(2): 193–205. (doi:<https://doi.org/10.1111/jfs.12171>)

13 Sharma P., Tomar S.K., Goswami P., Sangwan V., Singh R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics *Food Res. Int.* 2014, 57: 176–195. (doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>)

14 Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.*, 2013, 4: 1 – 6. (doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>)

15 Kitaevskaja S. V. Rezistentnost' probioticheskikh shtammov molochnokislyh bakterij k antibiotikam, *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta*, 2012, 21: 108–110. (<https://cyberleninka.ru/article/n/rezistentnost-probioticheskikh-shtammov-molochnokislyh-bakteriy-k-antibiotikam>)

16 Kozhakhmetova Z. A., *Study of the biological properties of specific strains of microorganisms and their use in the production of kumys.* Ph.D. Almaty, 2008.

17 Toomey N. Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*, 2009, 161: 127-135. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.010>)

18 Begunova A.V., Rozhkova I.V. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria with probiotic properties. *Dairy industry*, 2020, 9: 45-49

19 Gabriele A, Georges B. Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance. *The EFSAJ*, 2012, 10: 2740–2750. (<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>)

Р.Ж. МЫКТЫБАЕВА^{1*}, З.А. КОЖАХМЕТОВА¹, Ш.А. АЛЬПЕЙСОВ¹,
А.Р. САНСЫЗБАЙ¹, Ж.М. ӨТЕБАЕВ¹, С. ОЗКАЙА²

¹Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

²Испарта колданбалы ғылымдар университеті, Испарта, Түркия

e-mail: raya_myktybayeva@mail.ru

ТАБИҒИ КӨЗДЕРДЕН АЛЫНҒАН ЖАҢА ЛАКТОБАЦИЛЛАЛАР ШТАМДАРЫНЫҢ АНТИБИОТИКТЕРГЕ ТӨЗІМДІЛІГІ

Түйін

Ауыл шаруашылығы жануарларын, оның ішінде антибиотиктермен емдеу кезінде пайдалы микрофлораның белсенділігін төмендетеді, бұл өз кезегінде жануарлардың ішектерінде зардапты және ықтимал қауіпті микроорганизмдер санының көбеюіне әкеледі. Осыған байланысты пробиотикалық препараттардың құрамына микроорганизмдердің әр түрлі культураларын таңдағанда, антибиотиктерге төзімділік көрсететін қасиеттеріне үлкен мән беріледі. Бұл мақалада зерттеу объектілері табиғи көздерден бөлініп алынған сүтқышқылды бактериялардың жаңа

штамдары келесі бензилпенициллин, стрептомицин, полимиксин, канамицин, азитромицин, нистатин, ампицилин, карбенициллин секілді антибиотиктерге төзімділігі анықталды.

Кілтті сөздер: микроорганизмдер, бактерия штамдары, төзімділік, антибиотик.

МРНТИ: 68.41.35

Р.Ж. МЫКТЫБАЕВА^{1*}, З.А. КОЖАХМЕТОВА¹, Ш.А. АЛЬПЕЙСОВ¹,
А.Р. САНСЫЗБАЙ¹, Ж.М. ӨТЕБАЕВ¹, С. ОЗКАЙА²

¹Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

² Университет прикладных наук Испарта, Испарта, Турция

e-mail: raya_myktybayeva@mail.ru

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НОВЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.16

Аннотация

При лечении сельскохозяйственных животных различными лекарственными препаратами, в том числе антибиотиками, довольно часто наблюдается подавление деятельности полезной микрофлоры, что, в свою очередь, вызывает увеличение в кишечнике количества патогенных и потенциально опасных для здоровья животных микроорганизмов. В связи с этим, большое значение при подборе различных культур микроорганизмов в состав пробиотических препаратов придается такому свойству, как устойчивость к антибиотикам. В данной статье объектами исследования послужили новые штаммы молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников, проявляющих антибиотикорезистентность к следующим антибиотикам: бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампицилину, карбенициллину.

Ключевые слова: микроорганизмы, штаммы бактерий, устойчивость, антибиотики.

Мировой опыт свидетельствует, что в профилактике и лечении желудочно-кишечных болезней молодняка с/х животных и птиц большое значение имеет заместительная терапия, направленная на восстановление кишечного биоценоза путем регулярного введения живых бактерий – представителей нормальной кишечной микрофлоры [1].

В современных условиях для нейтрализации микотоксинов, попадающих в пищеварительный тракт с кормами, все шире используются пробиотические препараты, в составе которых имеются живые представители полезных микроорганизмов. Пробиотики можно вводить в корма в виде лиофилизированных порошков и в жидкой форме (они содержат бифидо-, пропионовокислые бактерии, лактобациллы, молочнокислые стрептококки и их комбинации) с целью восстановления нормальной микрофлоры кишечника, активизации ферментолиза питательных веществ кормов, укрепления иммунитета организма, увеличения скорости роста молодняка и др. [2].

Согласно регламентированным требованиям, термин «пробиотик» означает функциональный пищевой ингредиент в виде полезных для человека и животных непатогенных и не токсикогенных живых микроорганизмов. К пробиотикам относятся преимущественно представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также отдельные штаммы некоторых видов *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* и *Saccharomyces* [3,4].

Следует отметить, что антибиотики оказывают отрицательное влияние на развитие молочнокислых бактерий. Это происходит, когда антибиотики, попадая в пищевое сырье при лечении с/х животных, могут подавлять развитие микрофлоры пробиотика при технологическом процессе производства продуктов, что ухудшает их качество и создает

потенциальную опасность для развития посторонней антибиотикоустойчивой микрофлоры. При нерациональном лечении человека и с/х животных антибиотиками наблюдается подавление деятельности полезной микрофлоры, вызывающей увеличение в кишечнике числа патогенных и потенциально опасных для человека и с/х животных микроорганизмов. Поэтому немаловажное значение при подборе культур микроорганизмов в состав пробиотических препаратов и созданных на их основе продуктов питания придается такому свойству, как устойчивость к антибиотикам.

Известно, что совместное применение антибиотиков и устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника уже в процессе антибиотикотерапии [5,6].

Устойчивость к антибиотикам природных штаммов лактобактерий и дрожжей является видовым свойством. При этом антибиотикорезистентность молочнокислых бактерий может быть положена в основу использования таких штаммов для производства новых продуктов питания и лечебных препаратов, которые станут главными средствами борьбы с патогенами желудочно-кишечного тракта.

Рядом исследователей было проведено изучение антибиотикорезистентности штаммов *Bacillus subtilis* к 14 антибиотикам, которые наиболее часто применяются в клинике. В результате выявлено, что штамм *B. subtilis* 1719 оказался более устойчив к гентамицину, полимиксину и эритромицину, а штаммы *B. subtilis* 1594 и *B. subtilis* 1318 были резистентны только к гентамицину [7].

Таким образом, изучение чувствительности к противомикробным препаратам бактериального штамма дало основание для его утверждения в качестве пробиотика. В ряде источников авторы отмечают, что в случаях одновременного назначения с антибиотиками для предупреждения и лечения кишечных расстройств, пробиотики должны быть устойчивы к определенным антибиотикам для того, чтобы выжить в желудочно-кишечном тракте.

При этом особенное внимание уделяется исследованию антимикробных свойств молочнокислых бактерий, так как они обладают различными преимуществами в качестве средств борьбы с антибиотикорезистентными патогенами.

Природная устойчивость к некоторым антибиотикам свойственна бифидо- и молочнокислым бактериям. Штаммы с природной устойчивостью к антибиотикам считаются пригодными для применения в качестве пробиотиков [8].

Материалы и методы исследования

Объектами для проведения исследования служили штаммы молочнокислых бактерий из рода *Lactobacillus* 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1, 7К-16L, 17К-6L12 выделенные из природных источников. Для изучения антибиотической резистентности лактобацилл использовали известную диско-диффузную методику со стандартными дисками антибиотиков, пропитанных стандартными растворами бензилпенициллина, стрептомицина, левомицитин, полимиксина, канамицина, азитромицина, нистатина, тетрациклин, ампицилина, карбенициллина.

В качестве питательной среды для молочнокислых бактерий использовали агар с гидролизированным молоком (АГМ) и MRS-1. Для этого в стерильные чашки Петри наливали расплавленную агаризованную питательную среду, после остывания ее высушивали в термостате. На поверхность застывшей питательной среды наносили односуточную культуру, выращенную при оптимальной температуре в виде суспензии клеток в количестве по 1 мл, 1 млрд. суспензионной взвеси испытываемого штамма, и шпателем Дригальского равномерно распределяли по всей поверхности среды. Избыток жидкости удаляли, затем посеы подсушивали в термостате в течение 30 минут. После этого на поверхность засеянной среды стерильным пинцетом накладывали диски с антибиотиками на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки. Чашки Петри с дисками и антибиотиками выдерживали в течение 2–3 часов при комнатной температуре

(для временного торможения роста культур и диффундирования антибиотиков в толщу агара), а затем в термостате при +40°C до появления видимого роста культур. Во избежание размазывания зон конденсационной водой чашки ставили в термостат в перевернутом виде.

В процессе исследования были использованы российские диски (НИЦФ) для определения чувствительности к антимикробным препаратам.

Полученные результаты оценивали согласно [16], по определению чувствительности микробов к антибиотикам методом бумажных дисков, то есть для нечувствительных штаммов характерен рост вокруг бумажного диска; для слабочувствительных – зона диаметром до 15 мм; для чувствительных – зона диаметром от 15 до 25 мм и для высокочувствительных – зона диаметром более 25 мм

Результаты и обсуждение

Степень чувствительности выделенных новых штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам является важным фактором, так как при лечении антибиотиками молодняка с/х животных и птиц подавляется развитие микрофлоры желудочно-кишечного тракта или микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков. Антибиотикорезистентность новых выделенных штаммов лактобацилл определяли диско-диффузным методом, измеряя диаметры зон задержки роста. Из отобранных 5 штаммов лактобацилл, 3 были резистентны к 8 антибиотикам: бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампициллину и карбенициллину. Все исследованные штаммы молочнокислых бактерий оказались чувствительны к тетрациклину и левомецетину. Штамм лактобацилл 7К-16L резистентен к стрептомицину, полимиксину, канамицину, нистатину, слабо чувствителен к бензилпенициллину, азитромицину, тетрациклину, ампициллину и карбенициллину, чувствителен к левомецетину. Штамм лактобацилл 17К-6L12 показал резистентность к бензилпенициллину, нистатину, ампициллину, карбенициллину, слабую чувствительность к левомецетину, полимиксину, канамицину, чувствительность к стрептомицину, азитромицину и тетрациклину. Следует отметить, что вышеуказанные результаты наших исследований согласуются с данными Cano Rosa [9]. Также все исследованные штаммы лактобактерий оказались устойчивыми к бензилпенициллину, что отмечалось в работах, проведенных другими исследователями [10-14].

В своих исследованиях Китаевская С.В. [15] отмечает высокую чувствительность молочнокислых бактерий рода *Lactobacterium* к бензилпенициллину. В наших исследованиях выделенные новые штаммы молочнокислых бактерий так же были резистенты к бензилпенициллину.

Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица - Результаты антибиотикорезистентности новых выделенных штаммов лактобацилл

Штаммы	Антибиотики									
	бензилпенициллин	стрептомицин	бензилпенициллин	полимиксин	бензилпенициллин	азитромицин	бензилпенициллин	тетрациклин	бензилпенициллин	карбенициллин
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
7К-2L	6±0,1	6±0,1	15±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
7К-6L	6±0,1	6±0,1	15±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
5К-9L1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,2	6±0,1	6±0,1	6±0,1	13±0,2	6±0,1	6±0,1
7К-16L	6±0,1	6±0,1	20±0,2	6±0,2	6±0,1	15±0,2	6±0,1	15±0,2	13±0,2	13±0,2
17К-6L12	6±0,1	20±0,2	15±0,2	13±0,2	13±0,2	20±0,2	6±0,1	23±0,2	6±0,1	6±0,1

Из данных таблицы видно, что выделенный новый штамм лактобацилл 7К-2L был резистентен к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампицилину и карбенициллину, слабо чувствителен к тетрациклину, левомицетину, (зона подавления роста штамма 13–15 мм). Штамм лактобацилл 7К-6L был резистентен к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампицилину и карбенициллину, слабо чувствительны к тетрациклину, левомицетину (зона подавления роста штамма 13-15 мм). Штамм лактобацилл 5К-9L1 был резистентен к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампицилину и карбенициллину, слабо чувствительны к тетрациклину, левомицетину, (зона подавления роста штамма 13-15 мм). Штамм лактобацилл 7К-16L резистентен к стрептомицину, полимиксину, канамицину, нистатину, слабо чувствителен к бензилпенициллину, азитромицину, тетрациклину, ампицилину и карбенициллину (зона подавления роста штамма 10-15 мм), чувствителен к левомицетину (зона подавления роста штамма 20 мм). Штамм лактобацилл 17К-6L12 показал резистентность к бензилпенициллину, нистатину, ампицилину, карбенициллину, слабую чувствительность к левомицетину, полимиксину, канамицину (зона подавления роста штамма 13-15 мм), чувствительность к стрептомицину, азитромицину и тетрациклину (зона подавления роста штамма 20-23 мм).

На рисунках 1 и 2 приведена антибиотикорезистентность новых выделенных штаммов лактобацилл, исследованных диско-диффузным методом.

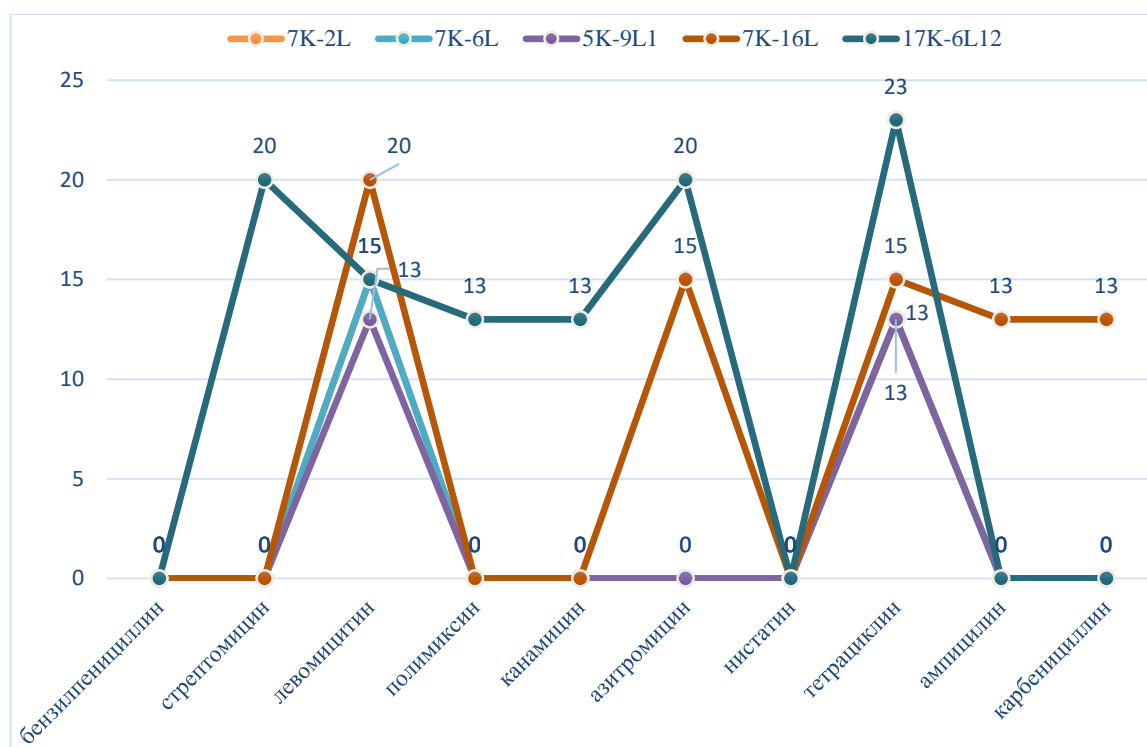


Рисунок 1 – Диаграмма антибиотикорезистентности новых выделенных штаммов лактобактерий

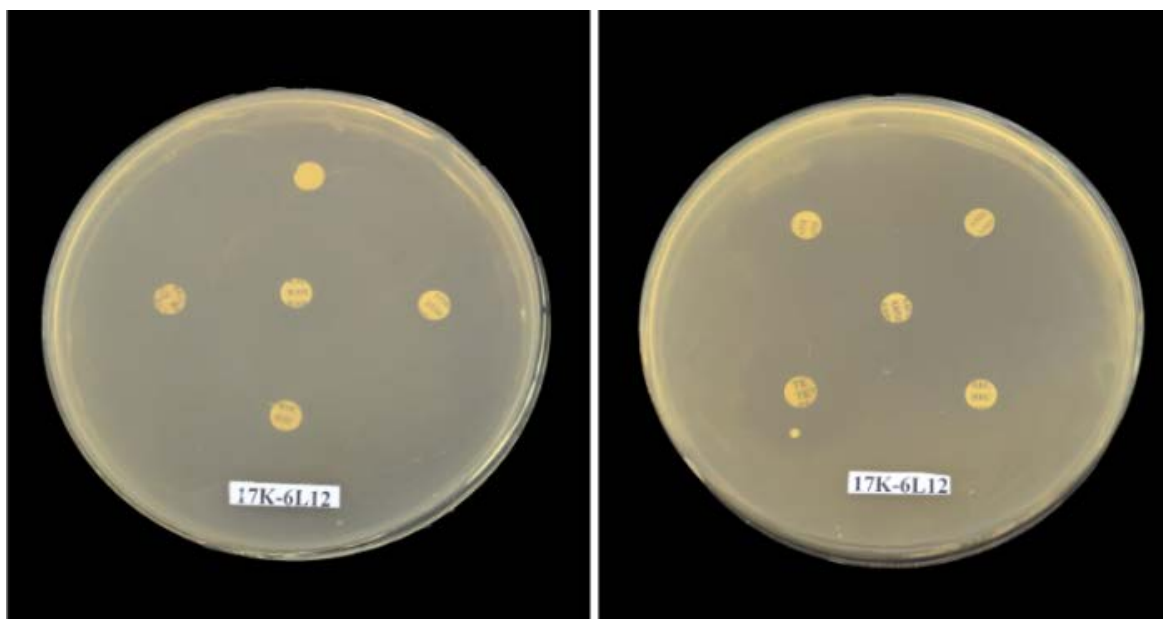


Рисунок 2 - Антибиотикорезистентность новых выделенных штаммов лактобактерий, исследованных диско-диффузным методом

Проведенный анализ показал, что рост штаммов лактобацилл 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1 вокруг дисков с антибиотиками свидетельствует об их резистентности к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампициллину и карбенициллину. При этом штаммы 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1 и 7К-16L продемонстрировали слабую чувствительность к левомицитину, тетрациклину, а штамм 17К-6L12 к данным антибиотикам оказался чувствителен. Образование зон просветления вокруг дисков со стрептомицином, левомицетином, полимиксином, канамицином, азитромицином и тетрациклином указывает на чувствительность лактобацилл к этим антибиотикам.

Проведенный анализ показал, что рост штаммов лактобацилл 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1, 7К-16L вокруг дисков с антибиотиками свидетельствует об их резистентности к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампициллину и карбенициллину. При этом штаммы 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1 и 7К-16L продемонстрировали слабую чувствительность к левомицитину, тетрациклину, а штамм 17К-6L12 к данным антибиотикам оказался чувствителен. Образование зон просветления вокруг дисков со стрептомицином, левомицетином, полимиксином, канамицином, азитромицином и тетрациклином указывает на чувствительность лактобацилл к этим антибиотикам.

Таким образом, на основании полученных результатов исследований можно констатировать, что следующие штаммы лактобацилл: 7К-2L, 7К-6L, 5К-9L1 – проявили высокую устойчивость к бензилпенициллину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампициллину и карбенициллину.

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 тетрациклинам и эритромицину [17, 18].

Природная устойчивость к некоторым антибиотикам свойственна бифидо- и молочнокислым бактериям. Штаммы с природной устойчивостью к антибиотикам считаются пригодными для применения в качестве пробиотиков и заквасок для кисломолочных продуктов [19].

Степень чувствительности молочнокислых бактерий к антибиотикам является важным аспектом, особенно в контексте их использования в ветеринарии. Изучение чувствительности выделенных новых штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам имеет большое значение для обеспечения безопасности и эффективности их применения в качестве пробиотиков.

На основании проведенных исследований установлено, что изученные штаммы относительно устойчивы к антибиотикам и могут быть рекомендованы для применения в составе пробиотического препарата для повышения иммунного статуса, а также нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных.

Заключение

Полученные результаты исследований позволяют сделать заключение, что штаммы лактобацилл, выделенные из кисломолочных продуктов разных географических зон, могут служить источником лечебно-профилактических препаратов нового поколения.

Чувствительность молочнокислых бактерий к антибиотикам является важным вопросом не только в случаях, когда микроорганизмы являются патогенными и вызывают инфекции, но также и для понимания изменений нормальной флоры кишечника, когда назначаются антибиотики, и при выборе штамма лактобактерий в качестве пробиотика.

Таким образом, изучение резистентности новых выделенных штаммов лактобацилл к 8 антибиотикам разных классов (бензилпенициллин, стрептомицин, полимиксин, канамицин, азитромицин, нистатин, ампициллин, карбенициллин), характеризует безопасность целевых штаммов, рассматриваемых в качестве потенциальных пробиотиков.

Из отобранных 5 штаммов лактобацилл 3 штамма были резистентны к 8 антибиотикам: бензилпеницилину, стрептомицину, полимиксину, канамицину, азитромицину, нистатину, ампицилину и карбенициллину. В целом все исследуемые штаммы лактобацилл были чувствительны к тетрациклину и левомицетину, а 2 из них показали слабую чувствительность к азитромицину, тетрациклину, ампициллину, карбенициллину.

Финансирование

Проведенные исследования выполнены в рамках Грантового финансирования Комитета науки Министерства науки и высшего образования РК (AP19677719).

Литература:

1 Сидоренко О. Д., Харькова А. П. Антибиотикочувствительность отдельных штаммов лактобактерий и дрожжей кисломолочных продуктов различных географических зон. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 2014, 2: 148-153. (https://scholar.google.com/Antibiotikochuvstvitel#nost#otdel'nyh_shtamnov_laktobakterij_i_drozhzhej_kislomolochnyh_produktov_razlichnyh_geograficheskikh_zon)

2 Selvin J, Maity D, Sajayan A, Kiran GS. Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020, 9(22): 202-205. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.007>)

3 Шендеров Б.А. *Функциональное питание и его роль*. М.: Дели Принт, 2008. (https://books.google.kz/books/about/Funkcional'noe_pitan.html?id=DpY6OQAACA AJ&redir_esc=y)

4 Bernhom N., Licht T.R., Brogren C.H. et al. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72: 1239-1244. (doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.239-244.2006>)

5 Артюхова С. И., Молибога Е. А. Изучение природной устойчивости микроорганизмов поликомпонентной закваски молочных продуктов к антибиотикам. *Вопросы питания*, 2005, 74(6): 34-36. (https://scholar.google.com/Izuchenie_prirodnoj_ustojchivosti_mikroorganizmov_polikomponentnoj_zakvaski_molochnyh_produktov_k_antibiotikam)

6 Виноградская С. Е. и др. *Изучение чувствительности молочнокислых культур и микрофлоры кисломолочных продуктов к антибиотикам*. Сборник научных трудов СевКавГТУ. Серия Продовольствие, 2005, 1: 19-23. (https://scholar.google.com/Izuchenie_chuvstvitel'nosti_molochnokislyh_kul'tur_i_mikroflory_kisломolochnyh_produktov_k_antibiotikam)

7 Гатауллин А. Г. *Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis* перспективных для создания новых пробиотиков*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2005. (<https://www.dissercat.com/content/biologicheskie-svoistva-shtammov-bacillus-subtilis-perspektivnykh-dlya-sozdaniya-novykh-prob>)

8 Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance. *The EFSAJ*, 2012, 10: 2740–2750. (doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>)

9 Cano Roca, Carmen Lucia *Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and Prebiotic Utilization*. Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology, 2014, 8: 46. (<https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/46/>)

10 Ammor, M.S., Belén Flórez A., Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*, 2007, 24(6): 559–570. (doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>)

11 Patel A., Shah N., & Prajapati J.B. Antibiotic resistance profile of lactic acid bacteria and their implications in food chain. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2012, 7: 202–211. (doi: [http://idosi.org/wjdfs/wjdfs7\(2\)/14.pdf](http://idosi.org/wjdfs/wjdfs7(2)/14.pdf))

12 Morandi S., Silveti T., Miranda Lopez J.M., Brasca M. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *J. Food Saf*, 2015, 35(2): 193–205. (doi:<https://doi.org/10.1111/jfs.12171>)

13 Sharma P., Tomar S.K., Goswami P., Sangwan V., Singh R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics, *Food Res. Int*, 2014, 57: 176–195. (doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>)

14 Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol*, 2013, 4: 1–6. (doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>)

15 Китаевская С. В. Резистентность пробиотических штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам, *Вестник Казанского технологического университета*. 2012. 21. (<https://cyberleninka.ru/article/n/rezistentnost-probioticheskikh-shtammov-molochnokislyh-bakteriy-k-antibiotikam>)

16 Кожухметова З. А., *Изучение биологических свойств специфических штаммов микроорганизмов и их использование при изготовлении кумыса*. Кандидат.дис. Алматы, 2008.

17 Toomey N. Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*, 2009, 161: 127-135. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.010>)

18 Бегунова А.В., Рожкова И. В. Антибиотикорезистентность молочнокислых бактерий с пробиотическими свойствами. *Молочная промышленность*, 2020, 9: 45–49

19 Gabriele A, Georges B. Guidelines on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance. *The EFSAJ*, 2012, 10: 2740–2750. (<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>)