

- 6 FAO Pesticide Disposal Series 2 "Prevention of accumulation of obsolete pesticide stocks", Provisional Guidelines, Rome, 1995. – 58 с.
- 7 Davis L.C., Castro-Diaz S., Zhang Q., Erickson L.E. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants // J. Critical Reviews in Plant Sciences – 2002. – Vol. 5, № 21. – P. 457-491.
- 8 Dowling D.N., Doty S.L., Improving phytoremediation through biotechnology // J. Curr. Opin. Biotechnol., – 2009. – Vol. 20. – P. 204-206
- 9 Sophie Pascal-Lorber, François Laurent. Phytoremediation Techniques for Pesticide Contaminations // Alternative Farming Systems, Biotech, Drought Stress and Ecol Fertlisation, Sustainable Agricul Reviews 6. – 2011. – Springer Science + Business Media. – P. 77-105.
- 10 Унифицированные правила отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов.– Алматы: Мин-во с/х РК, 1997. – 18 с.
- 11 Байтенов М.С. Флора Казахстана. – Алматы: Ғылым, 2001. – Т.1-2. – 450 с.
- 12 Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. – Л.: Наука, 1987. – 439 с.
- 13 Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. – Л.: Наука, 1981. – 509 с.
- 14 Рокицкий П.П. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1976. – 250 с.
- 15 Anderson T.A., Kruger E.L., Coats J.R. Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of an herbicide-tolerant plant // Chemosphere. – 1994. – Vol. 28. – P. 1551-1557.

Presented results about possible practical use of wild plants for phytotechnology of pesticide-contaminated soil.

Өсімдіктердің табиғи түрлерін пестицидтармен ластанған топырақты фиторемедиациялау үшін қолдану мүмкіндіктері жөніндегі нәтижелер келтірілген.

И.С. Савицкая, А.А. Жубанова, А.С. Кистаубаева, А.Б. Болекбаева

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ - ПРОБИОТИКОВ (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Исследованные штаммы лактобактерий обладали различным типом и уровнем устойчивости к антибиотикам. Большинство штаммов оказались устойчивыми к канамицину, офлоксацину, цiproфлорксацину, тетрациклину, гентамицину, эритромицину. Устойчивость к фторхинолонам сохраняется после многократных пассажей в неселективных условиях.

Для разработки новых препаратов пробиотического действия постоянно ведется поиск новых активных штаммов, отбор которых осуществляется по общепринятым в этой области исследований критериям. Это активное кислотообразование, высокая антагонистическая и адгезивная активность, устойчивость к антибиотикам [1]. Последнее связано с тем, что пробиотики в большинстве своем чувствительны к некоторым широко применяющимся в клинике антибактериальным препаратам, поэтому их использование совместно с антибиотиками считается неоправданным [2]. Для решения вопроса о возможности сочетанного применения пробиотиков и антибиотиков необходимо располагать сведениями о чувствительности к ним новых штаммов, на основе которых разрабатываются новые пробиотические препараты.

В связи с этим, цель исследований – определить спектр и генетическую природу антибиотикорезистентности штаммов лактобацилл.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы 12 новых штаммов лактобацилл, выделенных из кишечника 40 детей и взрослых обоего пола, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Чувствительность лактобактерий к антибиотикам определяли методом серийных разведений [2]. Выделение плазмидной ДНК проводили методом, описанным Lee S.Y. [3]. Электрофорез препаратов плазмидной ДНК проводили в горизонтальном 0,7% агарозном геле. Элиминацию плазмидной ДНК осуществляли путем инкубации исследуемых штаммов в среде, содержащей бромид этидия или акрифлавин в субингибиторных концентрациях.

Результаты и обсуждение

Для получения информации о природной устойчивости штаммов лактобацилл к антибактериальным препаратам определяли спектр их лекарственной устойчивости с помощью метода серийных разведений для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) (таблица 1).

Поскольку уровни чувствительности исследуемых штаммов к взятым антибиотикам сильно различаются, возникла определенная сложность с интерпретацией данных. Четких критериев для

отнесения того или иного штамма лактобацилл к чувствительным или резистентным не существует. В связи с этим эмпирически в качестве пограничных МПК были выбраны те концентрации из серии разведений препаратов, которые задерживали рост хотя бы одного из исследованных штаммов: для канамицина, тетрациклина – 50 мкг/мл, для цефазолина – 30 мкг/мл, для гентамицина, ципрофлоксацина, офлоксацина – 20 мкг/мл, для ампициллина, амоксициллина, эритромицина – 10 мкг/мл. Эти МПК встречаются и у других исследователей [2; 4].

Все исследуемые штаммы лактобацилл были одновременно устойчивы к нескольким препаратам. 5 штаммов: АА-1, АІ-17, АК-5, АК-9 и АР-1 имели по 3 маркера антибиотикорезистентности. Штаммы АА-9 и АП-4 были устойчивы к четырем, штаммы АК-2, АР-5, АС-1, АС-31 к пяти, а штамм LK-7 обладал множественной устойчивостью сразу к 6 антимикробным препаратам (таблица 2).

Таблица 1

Уровень антибиотикорезистентности штаммов лактобацилл

Штамм	МПК (мкг/мл) антибиотиков в отношении различных штаммов лактобацилл								
	Амино-гликозиды		β-лактамы		Фторхинолоны		Тетра-циклин	Це-фа-лоспор-ины	Макр-о-ли-ды
	Km	Gm	Ap	Am	Cip	Ofl	Tc	Cef	Ery
АА-1	10	10	5	5	20	10	50	30	5
АА-9	5	20	10	2,5	10	5	50	10	10
АІ-17	50	5	5	5	5	5	50	5	10
АК-2	50	20	10	2,5	20	20	20	10	2,5
АК-5	50	20	10	5	10	10	10	5	5
АК-9	50	10	2,5	5	20	5	50	20	5
АР-1	20	20	5	5	10	20	50	20	5
АР-5	10	10	10	10	5	10	50	10	10
АП-4	50	5	5	10	5	5	20	5	5
АС-1	50	20	10	5	10	5	50	10	10
АС-31	50	20	5	2,5	20	10	10	20	10
LK-7	50	20	2,5	10	10	20	20	10	10

Примечание: Km-канамицин, Gm-гентамицин, Ap-ампициллин, Am – амоксициллин, Cip – ципрофлоксацин, Ofl – офлоксацин, Tc – тетрациклин, Cef-цефазолин, Ery-эритромицин.

Большинство штаммов оказались устойчивыми к следующим антибиотикам: (в убывающем порядке) канамицину (9 штаммов), гентамицину (8 штаммов), тетрациклину (устойчивость наблюдается также у 8 штаммов), эритромицину (6 штаммов), ампициллину и офлоксацину (устойчивость к ним выявлена у 5 штаммов), ципрофлоксацину (4 штамма), амоксицилину (3 штамма) и только штамм АА-1 обладал резистентностью к цефазолину. Всего было выявлено 12 различных сочетаний маркеров устойчивости, т.е. каждый штамм имел индивидуальный спектр антибиотикорезистентности.

Таблица 2

Спектр антибиотикорезистентности 12 штаммов лактобацилл

Штамм	Количество маркеров	Фенотип устойчивости
АА – 1	3	Cef Tc Cip
АІ – 17	3	Km Tc Ery
АК – 5	3	Km Gm Ap
АК – 9	3	Km Tc Cip
АР – 1	3	Gm Tc Ofc
АА – 9	4	Gm Ap Tc Ery
АП - 4	4	Km Gm Am Ofc

AK - 2	5	Km Gm Ap Cyp Ofe
AP - 5	5	Km Ap Am Tc Ery
AC - 1	5	Km Gm Ap Tc Ery
AC - 31	5	Km Gm Cyp Ofe Ery
LK - 7	6	Km Gm Am Tc Ofe Ery

Генетической основой антибиотикорезистентности являются мутации в собственной ДНК микроорганизмов или внедрение чужеродной, т.е., приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам может иметь мутационную природу или детерминироваться приобретением плазмид резистентности. В последнем случае теоретически может происходить неконтролируемая передача плазмидных генов антибиотикорезистентности. В настоящее время микробиологи озабочены возможной ролью молочнокислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости. Показана возможность передачи R-плазмид от диких и «пробиотических» культур лактобацилл различным видам грампозитивных бактерий в условиях *in vitro* и *in vivo* [1; 5]. Эти находки настораживают и требуют контроля стартерных культур молочнокислых бактерий, используемых для производства продуктов питания, на отсутствие «опасных» плазмид. Представляется целесообразным включение в препараты-пробиотики резистентных штаммов, устойчивость которых контролируется хромосомой.

При исследовании антибиотикорезистентности 12 штаммов лактобацилл установлена высокая нестабильность этого признака. Так, при хранении штаммов в неселективных условиях спонтанная утрата одного или нескольких маркеров происходила уже после одного пассажа. Дополнительная обработка тестированных клонов этих штаммов с разным спектром резистентности кратковременным нагреванием 75⁰С в течение 5 секунд показала, что в этих условиях происходит утрата устойчивости к химиопрепаратам (таблица 3).

Таблица 3- Частота (в %) утраты маркеров антибиотикорезистентности у 12 штаммов лактобацилл после кратковременного воздействия повышенной температуры

Штамм	Маркер антибиотикорезистентности								
	Km	Gm	Ap	Am	Cip	Ofe	Tc	Cef	Ery
AA - 1	-	-	-	-	0	-	77	0	-
AI - 17	55	-	-	-	-	-	75	-	88
AK - 5	44	100	89	-	-	-	-	-	-
AK - 9	68	-	-	-	0	-	55	-	-
AP - 1	-	66	-	-	-	0	88	-	-
AA - 9	-	33	96	-	-	-	100	-	55
AP - 4	37	100	-	58	-	0	-	-	-
AK - 2	58	93	45	-	0	0	-	-	-
AP - 5	100	-	72	67	-	-	92	-	73
AC - 1	37	53	83	-	-	-	100	-	100
AC -31	100	100	-	-	0	0	-	-	38
LK - 7	47	68	-	100	-	0	100	-	76

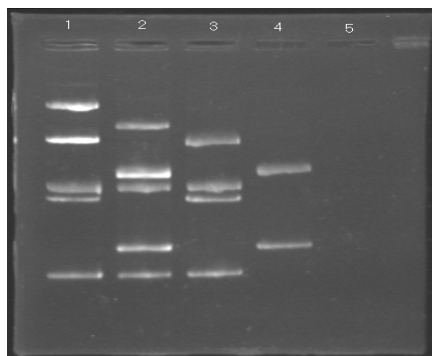
Наиболее часто утрачивалась устойчивость к бета-лактамам, аминогликозидам тетрациклину и эритромицину. Выявленная нестабильность антибиотикорезистентности лактобацилл к этим антибиотикам отмечается и другими авторами [5]. Этому можно найти объяснение, если предположить, что детерминанты устойчивости к этим антибиотикам имеют плазмидную локализацию, а к фторхинолонам и цефазолину – хромосомную. Это предположение нашло экспериментальное подтверждение.

Нестабильность многих физиологических свойств промышленных штаммов лактобацилл может объясняться экстрахромосомной локализацией некоторых генов. При этом многие исследователи пытались связать конкретные фенотипические черты, характеристики с определенными плазмидами по факту соответствия одновременной утраты плазмиды и признака. Потеря плазмиды может произойти спонтанно или после соответствующей обработки (повышенная температура, акридиновый оранжевый, акрифлавин, бромид этидия, рифампицин). Например, у штамма *L.fermentum*,

изолированном из фекалий, обнаружены плазмиды, кодирующие устойчивость к тетрациклину и эритромицину. Основанием для подобного заключения явилась одновременная утрата тетрациклинрезистентности и плазмиды молекулярной массой 10 МД после обработки акрифлавином [5]. Выращивание при повышенной температуре или обработка бромидом этидия сопровождалась элиминацией плазмид с одновременной потерей устойчивости к бацитрацину, хлорамфениколу и олеандомицину [6]. При элиминации плазмид лактобациллы становились чувствительными к стрептомицину, неомицину, гентамицину, канамицину, тетраамицину, рифампицину, полимиксину, колистину [4].

При выборочном исследовании у четырех штаммов установлено наличие плазмидной ДНК. Штаммы АС-31 и АК-2 содержали по 3 плазмиды, у штамма АР-1 обнаружено по 2 полосы плазмидной ДНК и штамм АА-1 содержал одну плазмиду (рисунок 1).

В соответствии с выявленными маркерами и данными электрофореза препаратов ДНК сравнивали уровни устойчивости к 9 антибиотикам у штаммов, содержащих плазмиды и их безплазмидных производных, которые были получены в результате воздействия этидиумбромида и акрифлавина. Данные этих экспериментов приведены в таблице 4.



Примечание: 1- *L.salivarius* АС-31; 2- *L.fermentum* АК-2; 3- *L.plantarum* АР-1; 4- *L.acidophilus* АА-1; 5 – ДНК культур лактобацилл после элиминации

Рисунок 1 – Плазмидный профиль штаммов лактобацилл *плазмид*

Воздействие на указанные культуры классических факторов, приводящих к потере плазмид привело к одновременной утрате признаков устойчивости к гентамицину у штаммов *L.salivarius* АС-31, *L.plantarum* АР-1 и *L.fermentum* АК-2, в то же время их плазмидный профиль свидетельствует о наличии во всех трех штаммах одинаковой по размеру плазмиды (рисунок 1), которая может содержать гены, контролирующие устойчивость к нему. Элиминация плазмид сопровождалась потерей резистентности к канамицину у штаммов *L.salivarius* АС-31 и *L.fermentum* АК-2 (они также имеют общую полосу плазмидных ДНК). Аналогичный результат был получен и для тетрациклина, т.е. потеря плазмид коррелировала с появлением чувствительности к этому антибиотику у ранее резистентных штаммов *L.plantarum* АР-1 и *L.acidophilus* АА-1. У этих культур также отмечено одновременное присутствие одной идентичной полосы. Кстати, по данным электрофореза в штамме *L.acidophilus* АА-1 присутствует только 1 плазида, но после ее утраты у этого штамма сохраняется резистентность к ципрофлоксацину и офлоксацину. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о локализации в плазмидах детерминант устойчивости в канамицину, гентамицину, тетрациклину, ампициллину и эритромицину. О таком расположении генов, определяющих устойчивость к этим антибиотикам, уже упоминалось ранее при исследовании плазмид у лактобактерий [2].

Сохранение резистентности к ципрофлоксацину, офлоксацину, и цефазолину у безплазмидных вариантов этих же штаммов говорит о возможном расположении данных детерминант в хромосоме. Для дополнительного подтверждения обнаруженного феномена проведена серия экспериментов по многократному пассированию указанных штаммов на селективных средах, содержащих данные антибиотики и без них. Результаты суммированы в таблице 5.

Таблица 4 - **Уровни антибиотикорезистентности штаммов, содержащих плазмиды и их безплазмидных производных**

Штаммы	Вариант	МПК, мкг/мл					
		Km	Gm	Ap	Cip	Ofl	Ery

AA - 1	исходный	10	10	5	20	10	5
	+ ЭБ	10	5	5	20	10	5
	+АФ	10	5	5	20	10	5
AP - 1	исходный	20	20	5	10	20	5
	+ ЭБ	20	5	5	10	20	5
	+АФ	20	2,5	5	10	20	5
AK - 2	исходный	50	20	10	20	20	2,5
	+ ЭБ	10	5	5	20	20	2,5
	+АФ	5	5	2,5	20	20	2,5
AC - 31	исходный	50	20	5	20	10	10
	+ ЭБ	10	5	5	20	10	5
	+АФ	10	5	5	20	10	2,5

Таблица 5 - Антибиотикочувствительность штаммов, содержащих плазмиды после многократных пересевов на средах с антибиотиками и без них

Штаммы	Присутствие антибиотика в среде	Km	Gm	Ap	Cip	Ofl	Ery
AA - 1	+	S	R	S	R	S	S
	-	S	S	S	R	S	S
AP - 1	+	S	R	S	S	R	S
	-	S	S	S	S	R	S
AK - 2	+	R	R	R	R	R	S
	-	S	S	S	R	R	S
AC - 31	+	R	R	S	R	S	R
	-	S	S	S	R	S	S

Примечание: R – резистентный; S – чувствительный.

Оказалось, что в процессе неоднократных (20-30) пассажей на селективных средах с антибиотиками, все резистентные к ним культуры остаются таковыми. Однако, исключение антибиотика из ростовой среды приводит к спонтанной утрате маркеров резистентности к канамицину, гентамицину, ампициллину, тетрациклину, эритромицину. Устойчивость штаммов к антибиотикам ципрофлоксацину и офлоксацину сохраняется при повторных пересевах, даже когда все штаммы были свободны от плазмидной ДНК.

Механизм бактерицидного действия фторхинолоновых препаратов последнего поколения ципрофлоксацина и офлоксацина связан с ингибированием двух жизненно важных для бактериальной клетки ферментов из группы топоизомераз – ДНК-гиразы (в большей степени) и топоизомеразы IV. Эти ферменты осуществляют конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации ДНК. Гены обоих ферментов находятся на бактериальной хромосоме [7].

В связи с этим на первых этапах клинического применения фторхинолов полагали, что резистентность микроорганизмов к ним практически не будет развиваться. Основаниями для такого суждения были специфический механизм антимикробного действия, быстрый бактерицидный эффект и отсутствие убедительных данных о плазмидном механизме передачи устойчивости для класса хинолонов [8]. Однако сейчас очевидно, что проблема антибиотикорезистентности в полной мере затрагивает и эту группу антибиотиков. Резистентность микроорганизмов к фторхинолам развивается медленно по типу хромосомной и связана с мутациями в генах, кодирующих ДНК-гиразу или

топоизомеразу IV. Уровень резистентности бывает более высоким при многоступенчатых мутациях. При этом резистентность развивается только к фторхинолам [9].

Приведенная информация находится в полном соответствии с полученными в работе данными и дает основание заключить, что резистентность штаммов лактобацилл к ципрофлоксацину и офлоксацину имеет хромосомную природу.

1 Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. КМК Scientific Press: М. - 2003. – 220 с.

2 Лыкова Е.А. Антибиотиковая резистентность штаммов входящих в состав препаратов пробиотиков //ЖМЭИ. – 2000. - №2. - С. 64-66.

3 Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. – 1990. - Vol.9. - №6. - P. 676-979.

4 Козлова Е.В., Пивоваренко Т.В., Малиновская И.В., Аминов Р.И., Коваленко Н.К., Боронин А.М. Устойчивость к антибиотикам штаммов лактобацилл // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. – Т.37. - №6. – С.12-15.

5 Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Панасенко В.И. Генетическая природа антибиотикорезистентности лактобацилл // Антибиотики и химиотерапия. – 1989. – Т.34. - №7. – С.539-545.

6 Тюрин М.В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл: Дис. ... канд. мед. наук. - М., 1990. – 146 с.

7 Сидоренко С.В. Роль хинолов в антибактериальной химиотерапии. Механизм действия, устойчивость микроорганизмов, фармакинетика и переносимость// РМЖ. - 2003. - Т. 11. - №2. - С. 98-102.

Яковлев В.П., Падейская Е.Н., Яковлев С.В. Ципрофлоксацин в клинической практике. М. - 2000. - 272с.

Падейская Е.Н. Юбилейные даты высокоактивных антимикробных препаратов: ципрофлоксацин // Фарматека. - 2007. - №17. - С. 45-52.

Зерттелген лактобактерия штамдары эртүрлі антибиотикке тұрақтылық қасиетімен анықталды. Көптеген штамдар канамицинге, офлоксацинге, ципрофлоксацинге, тетрациклинге, гентамицинге және эритромицинге тұрақтылық қасиетін көрсетті. Фторхинолонға тұрақтылық бірнеше пассажаға дейін сақталады.

Investigated strains of lactobacilli possessed various type and a level of stability to antibiotics. The majority of strains have appeared steady to canamicin, ofloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamycin and erythromycin. Stability to phtorhinolons is kept after repeated passages in not selective conditions.

И.С. Савицкая, А.С. Кистубаева, М. Абдулжанова, Ж. Жумагалиева

ПРИНЦИПЫ ОТБОРА ШТАММОВ ДЛЯ НОВОГО ЛАКТОСОДЕРЖАЩЕГО ПРОБИОТИКА (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

В последние годы интенсивно развивается биотехнология пробиотиков – препаратов, используемых для коррекции и профилактики микробиологических нарушений в желудочно-кишечном тракте человека и животных [1]. Поскольку, в кишечнике человека доминируют бифидобактерии и лактобациллы, большинство пробиотиков создается на основе этих бактерий [2]. Эффективность пробиотических препаратов определяется совокупностью биологических свойств штаммов, входящих в состав препарата [3]. Производственные бактерии должны обладать набором характеристик, позволяющих им конкурировать с патогенными и условно патогенными микроорганизмами. К ним относятся: апатогенность, антагонистическая активность, способность к адгезии и колонизации слизистой кишечника, активность кислотообразования, определенный уровень резистентности к соляной кислоте и желчи [4]. Повышение эффективности и расширение спектра биологической активности лактосодержащих пробиотиков может быть достигнуто за счет разработки комплексных препаратов на основе специально подобранных бактериальных композиций, включающих совместимые и взаимодополняющие штаммы [5].

Цель работы: сконструировать бактериальную композицию с учетом совместимости входящих в нее штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для составления бактериальных композиций использовали 10 штаммов лактобацилл, выделенных из кишечника 20 детей и взрослых обоего пола, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Антагонистическую активность исследовали методом отсроченного антагонизма в отношении стандартного набора тест-культур [6], а также гомоантагонизма – при совместном культивировании штаммов лактобацилл на плотной питательной среде [7]. Адгезивную активность определяли по