

## БІАЛОГІЯ

УДК 619:616.34-008.314.4.

Е. А. Бодяковская, Т. Н. Агеева

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ  
К АНТИБИОТИКАМ В ПРИСУТСТВИИ ЭНТЕРОСОРБЕНТА**

*В данной статье представлены результаты исследований по изучению влияния фитосорбента СВ-2 на рост культуры *Escherichia coli* и на ее чувствительность к антибиотикам в присутствии данного сорбента в условиях *in vitro*. Исследования проводили с использованием метода диффузии в агар с помощью дисков, содержащих антибиотики. Тест-объектом служил музейный штамм *Escherichia coli* 11-слк-5. Использовали стандартные бумажные диски, содержащие двенадцать различных антибиотиков.*

*В ходе эксперимента установлено, что фитосорбент СВ-2 подавляет рост *Escherichia coli* в условиях *in vitro* в среднем на 15%, а также в его присутствии большинство антибиотиков увеличивают зону задержки роста данного микроорганизма, причем в широком диапазоне – от 3,8% до 71,6%.*

**Введение**

В настоящее время для лечения многих заболеваний животных используются антибиотики. Действительно они имеют ряд преимуществ: обладают бактерицидным и бактериостатическим действием, активизируют защитные механизмы организма, повышают барьерные функции печени и селезенки, увеличивают содержание в крови  $\gamma$ -глобулинов, ферментов и фагоцитов, ускоряют проникновение фагоцитов из крови в ткани [1], [2]. Однако их неправильное применение может приводить не только к нарушению нормального функционирования органов и тканей, но и к их накоплению в организме животного. В этой связи встает вопрос: а всегда ли можно гарантировать их отсутствие в продукции животноводства, потребляемой в пищу человеком?

Исходя из этого, на сегодняшний день довольно актуален поиск оптимальных методов, способных осуществлять общую детоксикацию организма животных с тем, чтобы, с одной стороны, нормализовать статус их здоровья, с другой – организовать разрыв порочной цепи перехода и кумуляции токсинов в системе «животное – продукция животноводства – человек» [3].

Таковыми могут являться методы эфферентной терапии (от латинского *effere* – выводить). Среди них всё большее применение находят плазмасорбция, плазмоферез, иммунсорбция, энтеросорбция и др. При всем значительном количестве методов мы выделяем энтеросорбцию как наиболее физиологичный, не вызывающий осложнений и не требующий значительных материальных затрат, удобный в применении метод. Суть энтеросорбции заключается в пероральном введении ряда веществ – сорбентов, свойства которых направлены на удерживание на своей поверхности токсигенных компонентов химуса. Таким образом, энтеросорбция – эфферентный метод, основанный на связывании и выведении из организма через желудочно-кишечный тракт с лечебной или профилактической целью эндогенных и экзогенных веществ, в том числе и накопившихся в тканях и органах антибиотиков [4].

К применяемым в медицине энтеросорбентам предъявляются следующие требования:

- ✓ отсутствие вредных примесей;
- ✓ выраженные механизмы сорбции токсичных компонентов химуса;
- ✓ хорошая эвакуация из кишечника, отсутствие диспепсических явлений при эвакуации;
- ✓ отсутствие влияния на биоценоз микрофлоры желудочно-кишечного тракта;
- ✓ отсутствие негативных сдвигов в системе гомеостаза при проведении энтеросорбции;
- ✓ обладание высокими эфферентными свойствами по отношению к эндо- и экзотоксинам [5].

Однако практика показывает, что далеко не все используемые сорбенты отвечают данным требованиям. Экспериментальным энтеросорбентом служит фитосорбент СВ-2 [6], который является модификацией ранее изучаемого сорбента СВ-1 [7], [8].

В качестве тест-объекта мы использовали *Escherichia coli*, т.к. она является одним из основных микроорганизмов, заселяющих желудочно-кишечный тракт и играющих особую роль в возникновении диспепсии и гастроэнтерита у сельскохозяйственных животных [9].

**Целью работы** было изучение влияния фитосорбента СВ-2 на рост культуры *Escherichia coli* и на ее чувствительность к антибиотикам в присутствии фитосорбента в условиях *in vitro*.

Исследование проводили с использованием метода диффузии в агар с помощью дисков, содержащих антибиотики [10]. Тест-объектом служил музейный штамм *Escherichia coli* 11-слк-5.

Показателем определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в присутствии фитосорбента СВ-2 являлась задержка роста культуры *Escherichia coli* в течение 16–18 часов. Использовали стандартные бумажные диски, содержащие следующие антибиотики: гентамицин, канамицин, левомицетин, линкомицин, неомицин, кларитромицин, полимиксин, стрептомицин, тетрациклин, ротроксимицин, эритромицин, энрофлоксацин.

Для проведения исследований готовили питательную среду – перевар Хоттингера – с содержанием 120–140 мг % аминного азота и 1–2% агара pH среды 7,2–7,4. Расплавленную среду разливали по 20 мл в стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности.

Суточную культуру *Escherichia coli*, выращенную на мясопептонном агаре в пробирках, суспензировали в стерильном 0,85% растворе хлорида натрия. Концентрацию микробных клеток устанавливали с помощью стандарта мутности (10 ед. МОС), а для получения исходного разведения 1 млрд. м. к. /мл взвесь разводили 1:10. Суспензию делили на 2 части. Первую часть оставляли без изменений, а во вторую добавляли стерильный порошкообразный фитосорбент СВ-2 из расчета 5 мг/мл. По 0,3–0,5 мл суспензии из первой части наносили на поверхность питательной среды в пяти чашках Петри и покачиванием их равномерно распределяли ее по всей поверхности. Точно также поступали и со второй частью суспензии. Чашки оставляли на 15–20 минут при комнатной температуре, а затем излишек жидкости отбирали пипеткой. Таким образом, часть чашек Петри содержала только культуру *Escherichia coli*, а в другой части, кроме нее, еще присутствовал фитосорбент. Для оценки влияния фитосорбента СВ-2 на рост культуры две чашки Петри оставляли только с ней, а две – с добавлением в культуру фитосорбента.

Для изучения влияния препарата на чувствительность *Escherichia coli* к антибиотикам в оставшиеся чашки вносили диски, пропитанные вышеуказанными препаратами. Контролем служил диаметр ингибирующей зоны роста культуры *Escherichia coli* вокруг дисков в чашках, не содержащих фитосорбента. Результаты учитывали через 16–18 часов, подсчитывая в первом случае, количество выросших колоний *Escherichia coli* в чистом виде и в присутствии фитосорбента СВ-2. Результативность во втором случае определяли по диаметру ингибирующей зоны роста культуры вокруг дисков с антибиотиками с помощью линейки. Исследования проводили трехкратно. Выводили среднее количество колоний *Escherichia coli*, выросших в чашках без фитосорбента СВ-2 и в его присутствии, а также средний диаметр ингибирующих зон вокруг дисков с антибиотиками.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Исследования показали, что чистая культура *Escherichia coli* на питательной среде давала в среднем  $990 \pm 68,3$  колоний на чашку, в то время как в присутствии фитосорбента СВ-2 в среднем получен рост  $841 \pm 63,1$  колоний при достоверности  $P < 0,05$ . Таким образом, если принять рост чистой культуры *Escherichia coli* за 100%, то СВ-2 угнетает ее рост в среднем на 15%. Из этого можно предположить, что СВ-2 обладают некоторым ингибирующим действием в отношении роста *Escherichia coli*.

При изучении влияния фитосорбента СВ-2 на чувствительность данной культуры к антибиотикам получены результаты, представленные в таблице.

Таблица – Диаметр зон задержки роста *Escherichia coli* вокруг дисков с антибиотиками

Название антибиотиков	Диаметр зон задержки роста в контроле, мм ( $\pm$ )	Диаметр зон задержки роста в присутствии фитосорбента СВ-2, мм ( $\pm$ )	Процент изменения диаметра зон задержки роста в присутствии СВ-2 относительно контроля, %
Гентамицин	$27,7 \pm 2,04$	$30,6 \pm 3,05$	+10,4
Канамицин	$25,3 \pm 1,53$	$26,3 \pm 1,52$	+3,9
Левомецетин	$28,0 \pm 1,00$	$33,7 \pm 2,08$	+20,3
Линкомицин	$14,3 \pm 1,53$	$16,7 \pm 1,53$	+16,8
Неомицин	$24,0 \pm 1,73$	$22,6 \pm 1,15$	-5,8
Ротроксимицин	$7,0 \pm 1,00$	$12,0 \pm 1,00$	+71,4
Полимиксин	$13,3 \pm 1,53$	$15,3 \pm 1,15$	+15,0
Тетрациклин	$23,6 \pm 1,53$	$25,0 \pm 1,00$	+5,9
Стрептомицин	$26,3 \pm 1,53$	$24,3 \pm 1,52$	-8,6
Кларитромицин	$6,3 \pm 0,58$	$10,3 \pm 1,52$	+71,6
Эритромицин	$7,0 \pm 1,00$	$11,3 \pm 1,52$	+61,4
Энрофлоксацин	$34,0 \pm 2,00$	$35,3 \pm 1,53$	+3,8

Как видно из таблицы, *Escherichia coli* наиболее чувствительна к левомицетину и энрофлоксацину, у которых диаметры задержки роста составляли соответственно в контроле – 28,0 и 34,0 мм, в опыте – 33,7 и 35,3 мм.

В присутствии фитосорбента СВ-2 большинство антибиотиков увеличивали зону задержки роста *Escherichia coli* от 3,8% до 71,6%, за исключением неомицина и стрептомицина, которые снижали ее на 5,8% и 8,6% соответственно. Наилучшие результаты показали ротроксимицин и кларитромицин, дававшие увеличение зоны задержки роста *Escherichia coli* соответственно на 71,4 и 71,6%. Исходя из полученных данных, можно отметить, что фитосорбент СВ-2 наряду с ингибирующим действием в отношении *Escherichia coli* повышает эффективность действия антибиотиков на данный микроорганизм.

Результаты наших исследований в отношении фитосорбента СВ-2 согласуются с данными других ученых [11], [12], согласно которым взаимодействие патогенных микроорганизмов с высокопористыми углеродными волокнами сорбентов приводит к деструкции патогенных микробных клеток. Это рассматривается как трехэтапный процесс, включающий:

- прочную адгезию микробных клеток к поверхности волокон;
- последующую их деструкцию;
- прочное закрепление клеток и фрагментов их на волокнах на весь период, вплоть до выведения их из организма.

Все три этапа реализуются, в основном, за счет комплекса свойств углеродных волокон (огромного адсорбционного потенциала, электрохимических свойств, функциональных групп на поверхности, эффективного движения по кишечнику со 100% выведением из него). Патогенные микроорганизмы, вступая во взаимодействие с поверхностью углеродных волокон, претерпевают своеобразные и весьма характерные изменения, которые можно разделить на несколько фаз:

1) вблизи волокон в зоне действия мощного адсорбционного потенциала и электростатического потенциала происходит вытягивание клеточной стенки микроорганизма в направлении поверхности микроволокна или их ассоциации;

2) вслед за клеточной стенкой деформируется цитоплазматическая мембрана, за которой следует цитоплазма;

3) клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана приходят в соприкосновение с пористой поверхностью углеродного волокна. При этом, особенно для грамотрицательных микроорганизмов, прочность взаимодействия определяется за счет адгезии липополисахаридных и белковых клеточных стенок на поверхности углеродных волокон;

4) мембранные структуры микроорганизмов утрачивают морфологическую непрерывность, в результате чего происходит своего рода активное «вытекание» цитоплазматического матрикса микроба и связывание вещества цитоплазмы более глубокой внутренней пористостью углеродного волокна.

Необходимо отметить, что процесс имеет дискретный характер, т. е. взаимодействие микроорганизмов и сорбента происходит на ограниченных локальных зонах поверхности, а не на всей площади их внешней поверхности. Микробная клетка может оказаться под адгезионным и деструктурирующим действием сразу нескольких углеродных волокон (в случае их близкого взаимного расположения). Тогда наблюдается эффект «ножниц», т. е. клетка может быть разорвана, ее содержимое поглощено двумя и более волокнами, а оставшиеся фрагменты зафиксированы несколькими волокнами.

Одновременно с этим энтеросорбенты усиливают действие антибактериальных препаратов. В механизме этого явления лежит ряд закономерностей, включающих способность этих энтеросорбентов нарушать целостность клеточных структур патогенных микроорганизмов, способствуя тем самым более легкому проникновению антибактериальных препаратов в эти клетки, что потенцирует лечебный эффект комплексной терапии.

Все это указывает на то, что сорбенты можно не только использовать вместе с антибиотикотерапией, но и снизить количество вводимого в организм животного антибиотика, сохранив при этом максимальный эффект его действия.

#### **Выводы**

1. Фитосорбент СВ-2 подавляет рост *Escherichia coli* в условиях *in vitro* в среднем на 15%.
2. Повышается чувствительность данного микроорганизма в присутствии сорбента СВ-2 к большинству антибиотиков, причем в широком диапазоне – от 3,8% до 71,6%.

#### **Литература**

1. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии : справ. / В. Ф. Ковалев [и др.] ; под общ. ред. В. Ф. Ковалева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 174 с.
2. Мозгов, И. Е. Антибиотики в ветеринарии / И. Е. Мозгов. – М. : Колос, 1971. – 288 с.
3. Кузнецов, А. Ф. Использование минеральных энтеросорбентов в животноводстве / А. Ф. Кузнецов, А. В. Варюхин // Новые фармакологические средства в ветеринарии : материалы 7-ой межгос. межвуз. науч.-практ. конф. – Орел, 1995. – С. 20.

4. Беляков, Н. А. Альтернативная медицина: немедикаментозные методы лечения / Н. А. Беляков. – Архангельск : Сев.-Зап. изд-во, 1994. – 462 с.
5. Энтеросорбция / Н. А. Беляков [и др.] ; под общ. ред. Н. А. Белякова. – Л. : ЦСТ, 1991. – 328 с.
6. Панковец, Е. А. Исследование безвредности сорбента СВ-2 и его влияния на качество мяса сельскохозяйственных животных / Е. А. Панковец, Е. А. Боляковская // Ветеринарная медицина Беларуси – 2002. – № 3. – С. 15–17.
7. Лапина, В. А. Фитосорбент «Виктория» – новый перспективный сорбент, полученный из отходов сельскохозяйственного сырья / В. А. Лапина, А. С. Рубанов // Конверсия научных исследований в Беларуси в рамках деятельности МНТЦ : материалы Междунар. семинара, Минск : в 2 ч. – Минск, 1999. – Ч. 2. – С. 38–40.
8. Phytosorbent Prepared from Sunflower Seed Husks Prevents Mercury Chloride Accumulation in Kidney and Muscle of Adult Rabbits / V. A. Lapina [et al.] // Arch. Environmen Health., 1999. – S. 48–50.
9. Митюшин, В. В. Диспепсия новорожденных телят / В. В. Митюшин. – М. : Росагропромиздат, 1988. – 126 с.
10. Гиветаль, Н. И. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков / Н. И. Гиветаль [и др.] ; под ред. Н. И. Гиветалья. – М. : 1983. – 16 с.
11. Семенова, Т. Ф. Экспериментальное изучение антимикробной активности углеродных тканевых сорбентов / Т. Ф. Семенова, Е. Б. Горбовицкий // Сорбционные методы лечения в клинической практике : сб. науч. тр. – М., 1984. – С. 57–60.
12. Михайлов, И. В. Энтеросорбция / И. В. Михайлов // Медицинская помощь. – 1999. – № 5. – С. 47–51.

### Summary

This article presents the results the of research on study of the СВ-2 fitosobrent effect on the growth of the Escherichia coli culture and on its antibiotic sensitivity in the presence of this sorbent under the conditions in vitro. The research was carried out with the help of the method of agar diffusion by aid of discs, comprising antibiotics. The collection strain of Escherichia coli 11-slk-5 was the test object. The standard paper discs containing twelve different antibiotics were used.

In the course of study it has been found out that the СВ-2 fitosobrent suppresses the growth of Escherichia coli under the conditions in vitro on the average on 15%, as well as in his presence the majority of antibiotics enhance the zone of the growth delay of this microbe. Besides, over a wide range it varies from 3,8% up to 71,6%.

*Поступила в редакцию 19.03.08.*