

BOŻENA CZARNOCKA-ROCZNIKOWA, KAZIMIERZ KUJAWA, DANUTA KOŃNACKA

Próba zwiększenia oporności na antybiotyki szczepów *Lactobacillus acidophilus*

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Inżynierii i Biotechnologii Żywności
Wydziału Technologii Żywności AR-T, 10-957 Olsztyn, bl. 43

Występujące w przewodzie pokarmowym zwierząt gatunki rodzaju *Lactobacillus*, a szczególnie *L. acidophilus* mają istotne znaczenie zdrowotne. Hamując rozwój mikroflory enteropatogenicznej i gnilnej, regulują skład mikroflory jelit, a ponadto wytwarzany przez nie kwas mlekowy wpływa korzystnie na procesy trawienia i wchłanianie związków pokarmowych (1, 6, 10). Stąd preparaty zawierające żywe komórki odpowiednio dobranych szczepów pałeczek mlekowych znajdują coraz szersze zastosowanie w zapobieganiu i zwalczaniu zaburzeń trawien-nych u młodych zwierząt. Skuteczność tych preparatów w dużej mierze zależy od oporności użytych szczepów na antybiotyki. Dobór lekoopornych szczepów stwarza jednak duże trudności, gdyż bakterie fermentacji mlekowej odznaczają się wysoką wrażliwością na antybiotyki, a zwłaszcza penicylinę, hamującą rozwój licznych gatunków i szczepów nawet w śladowych ilościach (4, 9).

W przedstawionej wcześniej pracy (3) zbadano lekooporność 6 szczepów *L. acidophilus* pochodzących z przewodu pokarmowego cieląt i wyróżniających się wysoką aktywnością antibakteryjną wobec patogennych dla bydła serotypów *Escherichia coli*. Oporność badanych szczepów (najwyższa dawka hamująca wzrost) wynosiła dla penicyliny 0,3–0,5 j.m./cm³, dla streptomycyny 3–6 µg/cm³, dla ampicyliny 0,25–0,35 µg/cm³, a dla oksytetracyliny 10–25 µg/cm³. Założeniem obecnie przedstawionych badań było zwiększenie oporności wyselekcjonowanych szczepów na penicylinę i streptomycynę.

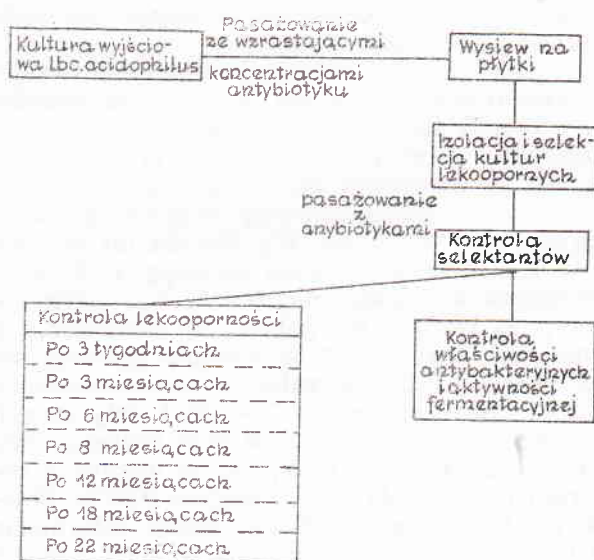
Materiał i metody

W badaniach zastosowano 3 wyselekcjonowane szczepy *L. acidophilus*, wyróżniające się wysoką aktywnością antibakteryjną, o symbolach III₆, IV₆ i IV₉₉ (3). W celu zwiększenia lekooporności stosowano pasażowanie hodowli bakteriynych ze wzrastającymi koncentracjami antybiotyków, a następnie izolację lekoopornych subkultur. Sposób postępowania przedstawiono schematycznie na ryc. 1. Warunki pasażowania szczepów z antybiotykami (kolejno z penicyliną i streptomycyną) były następujące: szczepy pasażowano co 24 godziny przez 3 tygodnie na mleku z ekstraktem drożdżowym (0,25%) stosując dodatek antybiotyków w ilościach zależnych od wcześniej określonej wrażliwości szczepów. Dla szczepów II₆ i IV₉₉ stosowano penicylinę w ilości 0,24–2,88 j.m./cm³, zwiększając jej koncentrację co 24 godziny początkowo o 0,12, później o 0,24, a w końcowym okresie o 0,48 j.m./cm³. Dla bardziej wrażliwego szczepu IV₆ stosowano penicylinę w ilości 0,12–2,26 j.m./cm³, zwiększając jej stężenie początkowo o 0,06, później o 0,12, a w końcowym okresie pasażowania o 0,24 j.m./cm³.

Streptomycynę stosowano dla szczepów III₆ i IV₉₉ w ilości 2–300 µg/cm³, zwiększając jej koncentrację przez pierwsze 4 dni o 2 µg, przez następne 4 dni o 5 µg, później o 10 µg, a w końcowym okresie pasażowania o 20 µg/cm³. Dla szczepu IV₆ stosowano streptomycynę w ilości 1–200 µg/cm³, zwiększając jej stężenie przez pierwsze cztery dni o 1 µg, przez następne 4 dni o 2 µg, później o 5 µg, a w końcowym okresie o 10 µg/cm³. Pasażowanie przerywano, kiedy zastosowana dawka antybiotyków powodowała opóźnienie koagulacji mleka (czas koagulacji ponad 24 godziny).

Po zakończeniu pasażowania z antybiotykami izolowano kultury stosując podłoże LBS, po czym badano ich oporność na stosowane antybiotyki, uwzględniając po 15 kultur dla każdego szczepu i antybiotyku. Selektanty o najwyższej oporności poddawane były jeszcze dalszemu pasażowaniu z penicyliną i streptomycyną stosowanymi w odwrotnej kolejności niż podczas I etapu adaptacji. Dla szczepów III₆ i IV₉₉ stosowano penicylinę w ilości 2,2–3,84 j.m./cm³ zwiększając jej koncentrację co 24 godziny o 0,12 j.m./cm³, a dla szczepu IV₆ — 1,6–3,86 przy wzrastających dawkach o 0,12 j.m./cm³. Streptomycyna była stosowana dla wszystkich szczepów w ilości 180–320 µg/cm³, przy czym koncentrację tego antybiotyku były zwiększane co 24 godziny o 10 µg/cm³.

Lekooporne selektanty prowadzono na mleku przez 22 miesiące, przesiewając je co 7 dni na świeżo pożywkę. Oporność na antybiotyki kontrolowano po 3 tygodniach, a następnie po 3, 6, 8, 12, 18 i 22 miesiącach. Oznaczenia wykonywano wg zmodyfikowanej metody Neel-Colberta (8), określając aktywność kultur na podstawie czasu tworzenia skrzepu mleka. Oporność szczepów wyrażano najwyższą koncentracją antybiotyku, przy której stwierdzano jeszcze pełną aktywność szczepów. Uzupełnieniem badań była kontrola oporności na antybiotyki kultur utrwalanych



Ryc. 1. Schemat otrzymywania lekoopornych kultur *L. acidophilus*

przez zamrażanie w temp. -20 i -70°C oraz liofilizację z zastosowaniem jako czynnika ochronnego 1%-owego roztworu glutaminianu sodu (7). Kontrolę tę przeprowadzono po 6 miesiącach przechowywania utrwalonych kultur. Szczepy liofilizowane przechowywano w temp. 4°C , a zamrożone — w temperaturach mrożenia.

Kontrola szczepów z indukowaną lekoopornością obejmowała również ich aktywność fermentacyjną i właściwości antagonistyczne. Aktywność fermentacyjną określano w hodowlach na mleku na podstawie przyrostów kwasowości, oznaczanej przez miareczkowanie 0,25 n NaOH i wyrażanej w % kwasu mlekowego. Aktywność antybakteryjną badano we wspólnych hodowlach z patogennymi dla bydła serotypami *Escherichia coli* (O96:K61, O101:K i O20:K17) pochodzącymi z kolekcji Instytutu Weterynarii w Puławach. Liczebność populacji pałeczek *coli* oznaczano na podłożu VRBA podczas 48-godzinnej inkubacji, co 12 godzin. Jako kontrolę stosowano monokultury *E. coli*.

Wyniki i omówienie

Wszystkie selektanty otrzymane z pasażowanych kultur (I etap) wykazywały wysoką lekooporność, chociaż stopień jej był zróżnicowany. Najlepsze wyniki oporności na penicylinę uzyskano w przypadku szczepu III₆, który przed zabiegami indukowania lekooporności wykazywał mniejszą od innych szczepów wrażliwość na cztery badane antybiotyki (6). Oporność na penicylinę selektantów tego szczepu wahała się w granicach 2,04—2,88 j.m./cm³, podczas gdy oporność pierwotna wynosiła 0,4 j.m./cm³. Natomiast oporność na streptomycynę omawianego szczepu wahała się od 120 do 200 µg, przy wyjściowej — 20 µg/cm³. Wyższą jeszcze tolerancję streptomycyny, bo wahałą się w granicach 160—220 µg/cm³ wykazały selektanty szczepu IV₉₉. Pasażowanie z antybiotykami już wyselekcjonowanych kultur (II etap) pozwoliło na dalsze zwiększenie lekooporności — do 3,3 (szczepy III₆) i 3,66 j.m./cm³ (szczepy IV₆ i IV₉₉) dla penicyliny oraz 250 (III₆) i 300 µg/cm³ (IV₆ i IV₉₉) — dla streptomycyny (tab. 1 i 2).

Lekooporne selektanty prowadzono sposobem tradycyjnym przez 22 miesiące. W okresie tym ich oporność na penicylinę ulegała stopniowemu obniżeniu i wynosiła zależnie od szczepu od 1,6—1,8 j.m./cm³, podczas gdy w wyniku zabiegów indukcji uzyskano 3,3—3,66 j.m./cm³ (tab. 3). Jednakże z chwilą zakończenia doświadczenia zachowana oporność znacznie przewyższała tolerancję kultur wyjściowych. Np. selektanty szczepu III₆ tolerowały jeszcze koncentrację penicyliny wynoszącą 1,8 j.m./cm³, podczas gdy wyjściowa oporność tego szczepu wynosiła 0,4 j.m./cm³. Stwierdzono, że oporność na penicylinę, jaką zachowały badane szczepy po 22 miesiącach była zbliżona do oporności kultur handlowych Lacid i Lactowac określanych jako lekooporne.

Odmienne wyniki uzyskano w badaniach nad zachowaniem oporności na streptomycynę. Nie stwierdzono tu przypadku obniżenia oporności, a przeciwnie — podczas pasażowania kultur (bez dodatku antybiotyku) uzyskiwano nieco lepsze wyniki, niż na początku doświadczenia.

Tab. 1. Zmiany oporności szczepów *L. acidophilus* na penicylinę podczas procesu indukowania lekooporności

Szczepy	Oporność (najwyższa dawka hamująca) j.m./cm ³			
	wyjściowa	po I etapie pasażowania	wyizolowane selektanty	po zakończeniu procesu indukowania lekooporności (II etap)
III ₆	0,4	2,88	2,04—2,88	3,30
IV ₆	0,2	2,04	1,20—2,04	3,66
IV ₉₉	0,4	2,24	0,96—2,24	3,66

Tab. 2. Zmiany oporności szczepów *L. acidophilus* na streptomycynę podczas procesu indukowania lekooporności

Szczepy	Oporność (najwyższa dawka hamująca) µg/cm ³			
	wyjściowa	po I etapie pasażowania	wyizolowane selektanty	po zakończeniu procesu indukowania lekooporności (II etap)
III ₆	5	180	120—200	250
IV ₆	2	250	160—280	300
IV ₉₉	5	220	160—220	300

Po 22 miesiącach wszystkie szczepy okazały się wysoce odporne, tolerujące koncentrację streptomycyny 300—350 µg/cm³ (tab. 4). Jednakże nabyta oporność na ten antybiotyk okazała się cechą względnie stabilną, gdyż zbadane dodatkowo szczepy po 4 latach prowadzenia (nie utrwalane) wykazały znacznie obniżoną tolerancję streptomycyny (30—35 µg/cm³), aczkolwiek jeszcze 7-krotnie przekraczającą oporność wyjściową.

Szczepy z indukowaną lekoopornością, poddane utrwaleniu przez zamrażanie (-20 i -70°C) oraz liofilizację, a następnie przechowywane przez 6 miesięcy nie wykazały praktycznie zmian w oporności na obydwa stosowane antybiotyki. Jedynie w przypadku liofilizowanego szczepu IV₆ oporność na penicylinę uległa nieznacznemu obniżeniu z 2,4 do 2,2 j.m./cm³ (po regeneracji) przy nie zmienionej oporności na streptomycynę (350 µg/cm³). Wynika stąd, że zastosowane sposoby utrwalania pozwalają na zachowanie nabytej oporności szczepów na antybiotyki.

Kontrola aktywności antybakteryjnej nie wykazała istotnych różnic w zdolności hamowania wzrostu pałeczek *coli* (O86:K61) przez szczepy wrażliwe (wyjściowe) i z indukowaną opornością na antybiotyki. W hodowlach wspólnych, wzrost pałeczek *coli* był hamowany między 12 a 24 godziną inkubacji, a całkowita redukcja ich liczby, bądź redukcja do 10 j.t.k./cm³ była

Tab. 3. Zachowalność nabytej oporności szczepów *L. acidophilus* na penicylinę

Szczepy	Oporność wyjściowa j.m./cm ³	Oporność indukowana (selektanty) j.m./cm ³							
		początkowa	po 3 tygodniach	po 3 miesiącach	po 6 miesiącach	po 8 miesiącach	po 12 miesiącach	po 18 miesiącach	po 22 miesiącach
III ₆	0,4	3,3	2,5	2,4	2,2	2,2	2,0	2,0	1,8
IV ₆	0,2	3,66	3,5	3,3	3,0	2,8	2,4	2,2	1,8
IV ₉₉	0,4	3,66	3,3	2,8	2,2	2,0	1,8	1,8	1,6

Tab. 4. Zachowalność nabytej oporności szczepów *L. acidophilus* na streptomycynę

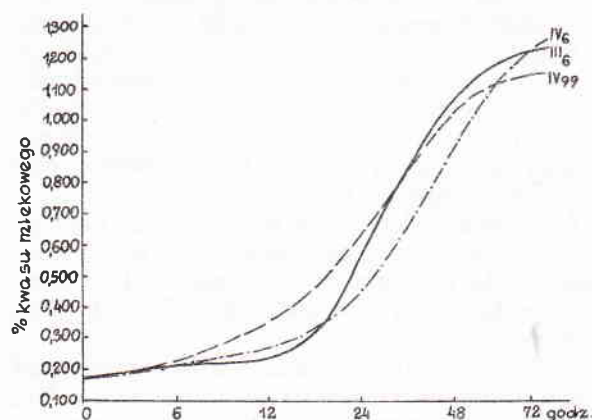
Szczepy	Oporność wyjściowa j.m./cm ³	Oporność indukowana (selektanty) j.m./cm ³							
		początkowa	po 3 tygodniach	po 3 miesiącach	po 6 miesiącach	po 8 miesiącach	po 12 miesiącach	po 18 miesiącach	po 22 miesiącach
III ₆	5	250	240	240	350	350	300	300	300
IV ₆	2	300	300	240	350	350	350	350	350
IV ₉₉	5	300	300	240	350	350	350	350	350

Tab. 5. Zmiany liczebności populacji *Escherichia coli* O86:K61 we wspólnej hodowli ze szczepami *L. acidophilus*

Szczepy	Liczba jednostek tworzących kolonie/cm ³				
	Czas inkubacji (h)				
	0	12	24	36	48
Monokultura <i>E. coli</i> (kontrola)	$2,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$
<i>E. coli</i> +L III ₆		$2,5 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	0	0
<i>E. coli</i> +L III ₆ — ind. lekooporność		$4,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	500	0
<i>E. coli</i> +L IV ₆		$3,0 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	0	0
<i>E. coli</i> +L IV ₆ — ind. lekooporność		$1,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	0	0
<i>E. coli</i> +L IV ₉₉		$3,3 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	15	10
<i>E. coli</i> +L IV ₉₉ — ind. lekooporność		$2,5 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	11	5

obserwowana po 36 godzinach. Jedynie w przypadku opornego na antybiotyki szczepu III₆ całkowitą redukcję liczby pałeczek *coli* stwierdzono po 48 godzinach inkubacji (tab. 5). Zbliżone wyniki uzyskano w badaniach wspólnych hodowli z zastosowaniem dwóch innych szczepów testowych *Escherichia coli* (O101:K i O20:K17).

Lekooporne selektanty hodowane w mleku przez 72 godziny wytwarzały kwas mlekowy w ilościach od 1,14 do 1,26%, przy czym największe przyrosty kwasowości obserwowano między 18 a 72 godziną inkubacji (ryc. 2). Zgodnie z informacjami piśmiennictwa, szczepy gatunku *L. acidophilus* znacznie różnią się rozwojem w mleku i ilością wytwarzanego kwasu, która wynosi 0,3—1,9% (2, 5). Zatem aktywność kwasząca badanych selektantów, chociaż nie może być uznana za wysoką, mieści się w granicach podawanych dla reprezentowanego przez nie gatunku.

Ryc. 2. Aktywność fermentacyjna lekoopornych szczepów *Lactobacillus acidophilus*

Wnioski

1. Metoda adaptacji, polegająca na kolejnym pasażowaniu szczepów *L. acidophilus* ze wzrastającymi dawkami penicyliny i streptomycyny pozwala na uzyskanie hodowli opornych na obydwa stosowane antybiotyki.

2. Wykazano, że podczas 22-miesięcznego okresu pasażowania szczepów nabyta oporność na streptomycynę pozostaje nie zmieniona, podczas gdy oporność na penicylinę ulega stopniowemu obniżeniu.

3. Utrwalanie szczepów przez zamrażanie w temp. -20 i -70°C oraz liofilizację pozwala na zachowanie nabytej oporności szczepów na obydwa antybiotyki.

4. Szczepy *L. acidophilus* z indukowaną opornością na antybiotyki zachowują nie zmienione właściwości antybakteryjne.

Piśmiennictwo

1. Ayebo A. D., Angelo I. A., Shahani K. M.: *Milchwiss.* 35, 730, 1930.
2. Bergey manual of determinative bacteriology. Wyd. 9, Baltimore, 1936.
3. Czarnocka-Rocznikowa B., Kujawa K.: *Medycyna Wet.* 39, 346, 1983.
4. Humphreys C. L., Plunkett M.: *Dairy Sci Abstr.* 31, 607, 1969.
5. Klupsch H. J.: *Dt. Molkerei Ztg.* 93, 925, 1972.
6. Kneifel W., Fotissy H.: *XXI Int. Dairy Congr.*, Moskwa 1, 320, 1982.
7. Kujawa K., Rocznikowa B., Drewek Z., *Warmińska-Radyko I., Kornacka D.: Acta Acad. Techn. Olszt. Techn. Aliment.* 22, 53, 1987.
8. Neel C. E., Colbert M. E.: *J. Dairy Sci.* 38, 629, 1955.
9. Reinhold G. W., Reddy M. S.: *J. Milk Fd Technol.* 37, 517, 1974.
10. Sandine K. S., Murailidhara K. S., Elliker P. R., England D. C.: *J. Milk Fd Technol.* 35, 691, 1972.

Adres autora: prof. dr hab. Bożena Rocznikowa, ul. Rybaki 38, 10-150 Olsztyn

Чарноцкая-Рочнякова Б., Куява К., Корнацкая Д. — Попытка увеличения антибиотика одстойчивости штаммов *Lactobacillus acidophilus*

В исследованиях использовали 3 изолированных из кала телят штамма *Lactobacillus acidophilus*, отличающиеся высокой антибактериальной активностью. Применяя метод адаптации, пассажируют штаммы с растущими дозами пенициллина, а затем стрептомицина. Изолированные и селекционированные культуры подвергали дальнейшим мероприятиям по индуцированию лекарственноустойчивости, увеличивая еще концентрации антибиотиков. Устойчивость штаммов к пенициллину была увеличена от 0,2—0,4 до 3,3—3,66 ме/см³, а к стрептомицину от 2—5 до 300—350 мкг/см. Приобретенная устойчивость к стрептомицину сохранялась в течение 22 мес. ведения опытов, толерантность же пенициллина постепенно уменьшалась в то время и после окончания опыта составляла 1,6—1,8 ме/см³. Фиксация культур через замораживание либо лioфилизацию позволила сохранить устойчивость к обоим антибиотикам. Устойчивые селектанты показали неизмененную активность торможения роста патогенных штаммов *Escherichia coli*.

Czarnocka-Rocznikowa B., Kujawa K., Kornacka D. — A trial to increase an antibiotic resistance of *Lactobacillus acidophilus*

The examinations were done with 3 strains of *Lactobacillus acidophilus* isolated from faeces of calves and revealing a high antibacterial activity. Using an adaptation method, the strains were grown on media with increased doses of penicillin and then streptomycin. The isolated and selected cultures were then grown on media containing a higher concentrations of the antibiotics. The resistance to penicillin increased from 0.2—0.4 to 3.3—3.66 iu/cm³ and to streptomycin from 2—5 to 300—350 µg/cm³. The acquired resistance to streptomycin persisted for 22 months and that to penicillin diminished in this time and after the end of the experiment it reached 1.6—1.8 iu/cm³. Freezing or lyophilization of bacterial cultures enables to preserve their resistance to the examined antibiotics. The selected resistant strains revealed unchanged activity to inhibit growth of pathogenic strains of *Escherichia coli*.

PATON M. W., MERCY A. R., WILKINSON F. C., GARDNER J. J., SUTHERLAND S. S., ELLIS T. M.: Wpływ serowaciejącego zapalenia węzłów i naczyń chłonnych na produkcję wełny i przyrosty masy ciała młodych jagniąt. (The effects of caseous lymphadenitis on wool production and body weight in young sheep). *Aust. vet.* 65, 117—119, 1988 (4)

Na 120 owcach rasy merynos w wieku 18 miesięcy przebadano wpływ zakażenia *Corynebacterium pseudotuberculosis* na produkcję wełny i przyrosty masy ciała. Do zakażenia użyto wyciągów z ropni, z których uzyskano czyste kultury *C. pseudotuberculosis*. Grupę kontrolną stanowiły owce szczepione szczepionką kombinowaną przeciwko *Clostridium* sp. i *C. pseudotuberculosis* oraz owce nie poddane szczepieniu. Owce zakażone sztucznie i nie poddane szczepieniu produkowały o 0,2 kg wełny mniej niż owce z grupy kontrolnej. Odsetek zwierząt ze zmianami w grupie owiec, które zaszczepiono przed zakażeniem był o 55% niższy niż w grupie nie szczepionej, zaś produkcja wełny nie wykazywała istotnych różnic w porównaniu do zwierząt z dwóch pozostałych grup. Szczepienie przyczyniło się do zwiększenia przyrostów masy ciała.

ARMITSU Y.: Nowa metoda diagnozowania leptospirozy; test aglutynacji w mikrokapsułkach (MCA). (A new method for diagnosis of leptospirosis; A microcapsule agglutination (MCA) test). *Isr. J. Vet. Med.* 44, 1—8, 1988 (1)

Odczyn aglutynacji mikroskopowej jest stosowany powszechnie jako metoda standardowa w rozpoznawaniu leptospirozy dzięki dużej swoistości i czułości. Jednakże ze względu na konieczność stosowania w teście różnych serotypów leptospirow, a także używania w odczynie jako antygenów żywych szczepów nie jest ona zalecana do rutynowej diagnostyki serologicznej leptospirozy. Celem przeprowadzenia tej niedogodności wprowadzono mikrokapsułki z syntetycznego polimeru służące jako nośnik antygeny oraz w oparciu o nie opracowano odczyn aglutynacji w mikrokapsułkach (MCA). Dzięki dużej stabilności antygeny, łatwości wykonania odczynu, jego dużej swoistości i czułości, a także małej pracochłonności odczyn MCA jest bardzo przydatny w diagnostyce serologicznej leptospirozy. Jego czułość w porównaniu z odczynem aglutynacji mikroskopowej w przypadku przeciwciał występujących w klasie IgM immunoglobulin jest od 8 do 128 razy wyższa.

G.

G.