

УДК 619:579:636.5

ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ВЕЩЕСТВАМ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

¹Исрапилова А.И., ^{1,2}Адиева А.А., ²Искакова А.А.

¹ФГБУН Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала;

²ГАОУ ДО РД «Центр развития талантов «Альтаир», Махачкала, e-mail: adieva-m@mail.ru

Аннотация. В контексте взаимоотношений человека и животных кишечная палочка (*E. coli*) выступает как в качестве комменсала кишечника, так и в качестве одного из наиболее важных патогенов человека и животных, способного вызывать кишечные и внекишечные инфекции. Устойчивость *E. coli* к антибиотикам неуклонно растет с момента первых зарегистрированных случаев, и из-за ее воздействия на здоровье человека она теперь включена вместе с остальными представителями семейства *Enterobacteriaceae* в список Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) из 12 семейств бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. В данной работе использованы вещества природного происхождения, обладающие противобактериальным действием. Показано наличие у соединений данного класса антибактериальных свойств в отношении изолятов, выделенных со смывов рук учащихся. Для сравнительного анализа были изучены коммерческие антибиотики, рекомендованные в лечении инфекций, вызванных данными бактериями. В результате микроскопического исследования на грязных руках учащихся было выявлено наличие кишечной палочки, стафилококка не обнаружено. Наиболее чувствительным в отношении кишечной палочки со средним значения ингибирования роста оказался цефтриаксон. Воздействие природных антибиотиков (лук, чеснок, лимон) на микрофлору грязных рук показало, что самым эффективным из них является чеснок.

Ключевые слова: антибактериальное действие, вещества, диско-диффузионный метод

ISOLATION OF *E. COLI* CULTURE AND DETERMINATION OF SENSITIVITY TO ANTIBACTERIAL OF NATURAL SUBSTANCES

¹Israpilova A.I., ^{1,2}Adieva A.A., ²Iskakova A.A.

¹Caspian Institute of Biological Resources of the Dagestan Federal Research Center
of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala;

²Altair Talent Development Center, Makhachkala, e-mail: adieva-m@mail.ru

Annotation. In the context of human-animal relationships *E. coli* acts both as an intestinal commensal and as one of the most important human and animal pathogens capable of causing intestinal and extra-intestinal infections. *E. coli*'s antibiotic resistance has been steadily increasing since the first reported cases, and because of its impact on human health, it is now included, along with the rest of the *Enterobacteriaceae* family, in the World Health Organization (WHO) list of 12 bacterial families that pose the greatest threat to human health. The work uses natural compounds. It is shown that compounds of this class have antibacterial properties in relation to isolates isolated from students' hand washes. For comparative analysis, commercial antibiotics recommended in the treatment of infections caused by these bacteria, as well as substances of natural origin with antibacterial effects, were studied. As a result of microscopic examination, the presence of *E. coli* was revealed on the dirty hands of the students, staphylococcus was not detected. Ceftriaxone showed the greatest biological activity against *E. coli*. The effect of natural antibiotics (onion, garlic, lemon) on the microflora of dirty hands has shown that garlic is the most effective of them.

Keywords: antibacterial effect, substances, discodiffusion method

Широкое распространение кишечной палочки в человеческой популяции и рост штаммов с устойчивостью к антибиотикам обуславливает поиск новых веществ синтетического происхождения, обладающих антибактериальным действием. Но вместе с тем в природе существует большое количество разнообразных естественных антибиотиков. Их содержат многие лекарственные растения: чеснок, лук, имбирь и т.д. В отличие от синтетических антибиотиков, они не подавляют иммунитет. Поэтому поиск новых соединений, обладающих антибактериальным действием, и сравнение их

с природными аналогами остается актуальной проблемой в современном мире.

Исследование терапевтической активности соединений теллура довольно ограничено в литературе, несмотря на относительно обилие теллура в организме человека. Сходство селена и теллура охватывает не только их отношение к позиции в периодической таблице химических элементов, но, в значительной степени, их химию и биохимию. Ранее исследования теллуродержащих соединений рассматривались только с точки зрения их токсических свойств. Однако получены новые интригу-

ющие данные, свидетельствующие о том, что соединения теллура имеют очень богатый потенциал использования в медицине, как в свое время селен, рассматривающийся только как ядовитое вещество, оказался важнейшим компонентом антиоксидантной защиты [1]. Были изучены биологические эффекты теллура и некоторых его неорганических и органических производных, и данные исследования привели к интересным и многообещающим результатам. В качестве примера можно выделить использование теллуридов и теллуридов щелочных металлов в микробиологии, антиоксидантное действие органотеллуридов и диорганотеллуридов и иммуномодулирующее действие нетоксичного неорганического теллурана [2].

При поступлении соединений теллура в клетку нарушается трансмембранный протонный градиент у *E. coli* независимо от уровня резистентности. Этот эффект сопровождается ингибированием синтеза АТФ, что приводит к истощению внутриклеточных запасов АТФ во время аэробного роста [1]. Такое же повреждающее действие соединений теллура обнаружено при синтезе белков, содержащих аминокислоты с восстановленными тиоловыми группами [1, 2] как у низко-, так и у высокорезистентных микробов.

E. coli – одна из наиболее изученных бактерий в мире. У людей *E. coli* является наиболее частой причиной инфекций мочевыводящих путей, она была идентифицирована как возбудитель заболевания практически во всех анатомических участках человеческого тела [3]. Кишечная палочка (*E. coli*) является нормальным обитателем человеческого организма, находясь в кишечнике и выполняя важные функции. Однако некоторые штаммы кишечной палочки могут вызывать серьезные заболевания, особенно у подростков. Подростковый организм чувствителен и уязвим к воздействию вредных бактерий, таких как кишечная палочка. Это может быть связано с неправильным питанием, недостатком гигиены или сопряженными заболеваниями. Многие подростки предпочитают быструю и удобную пищу, содержащую высокий уровень жиров, соли и сахара. Это может нарушить нормальное функционирование кишечной флоры и способствовать росту патогенных бактерий, включая кишечную палочку. Симптомы инфекции кишечной палочкой у подростков разнообразны и могут включать боли в животе, понос, рвоту, лихорадку и общую слабость. Если не обратить внимание на эти симптомы и не начать лечение, инфекция может развиваться

в более серьезные и опасные заболевания, такие как гастрит, воспалительные процессы, а в некоторых случаях и сепсис. Однако важно отметить, что большинство случаев инфекции кишечной палочкой у подростков могут быть предотвращены с помощью соблюдения основных правил гигиены и здорового питания. Правильное мытье рук перед едой, употребление свежих и натуральных продуктов, надлежащая обработка и приготовление пищи – все это может существенно снизить риск заражения кишечной палочкой [4]. В связи с широким распространением бактерии в человеческой популяции используют тесты на определение чувствительности. Полученные данные антибиотикограммы анализируются с учетом известных стандартов и рекомендаций по лечению инфекций, вызванных кишечной палочкой. Учитывая, что некоторые штаммы этих бактерий могут развивать устойчивость к антибиотикам, постоянный мониторинг чувствительности является крайне важным для эффективного лечения. Благодаря проведению антибиотикограммы можно выбрать оптимальное лечение, учитывая индивидуальную чувствительность пациента и способность антибиотиков подавлять рост кишечной палочки. Это позволяет достичь максимальной эффективности терапии и предотвратить возникновение повторных инфекций [5].

Целью настоящей работы было культивирование образцов *E. coli*, выделенных от подростков, и определение чувствительности данного микроорганизма к синтетическим веществам, обладающим антибактериальным действием, а также веществам природного происхождения.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести биологический эксперимент по выращиванию колоний бактерий *E. coli* из определенных участков подросткового организма и выявлению воздействия природных антибиотиков на них.

2. Исследовать природные антибиотики (лук, лимон и чеснок) и определить их влияние на микроорганизмы.

3. Провести анализ чувствительности данной флоры к коммерческим антибиотикам, используя диско-диффузионный метод.

4. Исследовать действие производных теллура на рост бактериальной культуры.

Материалы и методы исследования

Посевы на флору

Посев биоматериала проводили с целью выделения и идентификации экологически значимых микроорганизмов с определением чувствительности выделенных патоген-

нов к обычному спектру антимикробных препаратов. Основной целью микроскопического исследования мазка являлось обнаружение бактерий, а также оценка качества полученного материала. Микроскопическое исследование мазка проводили с помощью светового микроскопа после окрашивания по методу Грама.

Подготовка дисков с синтезированными теллуторганическими соединениями для проведения диско-диффузионного метода

Вначале было определено количество жидкости, которое впитывает диск. Для этого взвешивали сухие диски, затем выдерживали 5 мин в 1 мл воды и проводили повторное взвешивание. Сухой диск весил 0,0018 г, влажный диск – 0,0161 г. Разница составляла 0,0143 г, то есть диск впитывал 0,0143 мл воды за 5 мин. Далее рассчитали навеску на этот объем, чтобы на диске было, например, 135 мкг/мл для вещества 1. Для этого 0,0472 г вещества разводили в 5 мл фосфатного буфера и получали исходную концентрацию вещества 1. Вещества были разведены в пяти концентрациях с учетом их цитотоксичности. В качестве контроля использовали коммерческие диски и тради-

ционную постановку метода дисков и определения чувствительности флоры к ним [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Выявление микроорганизмов в подростковой среде и определение чувствительности их к антибиотикам

Для обнаружения уникальных образцов собственных патогенных микроорганизмов со смывов грязных рук и определения чувствительности их к мылу, антисептику и антибиотикам были взяты смывы с грязных рук 34 детей возрастной категории от 14 до 16 лет, участников профильной смены «Альтаир». В течение учебного дня детей просили не мыть и не протирать руки влажными салфетками, смывы брали в конце учебного дня. Для обнаружения кишечной палочки (*E. coli*) и стафилококка (*Staphylococcus aureus*) использовали стандартные питательные среды. Результаты представлены в табл. 1.

В результате посевов, взятых с необработанных рук учащихся, была выявлена кишечная палочка, стафилококк не обнаружен. При исследовании смывов с рук после обработки рук патогенные микроорганизмы не обнаружены.

Таблица 1

Результаты лабораторного исследования на кишечную палочку (*E. coli*) и стафилококк (*Staphylococcus aureus*)

Исследуемый материал	Кишечная палочка	Стафилококк
Пробирка № 1, смыв с грязных рук	Огромное количество, более 50 колоний	Нет роста
Пробирка № 2, смыв с чистых рук после мытья с мылом	Небольшое количество, 5–7 колоний	Нет роста
Пробирка № 3, смыв с чистых рук после обработки антисептиком	Нет роста	Нет роста
Пробирка № 4, смыв с пищеблока (разделочная доска)	Небольшое количество, 13–15 колоний	Нет роста
Пробирка № 5, контроль	Нет роста	Нет роста

Таблица 2

Определение чувствительности бактерий к производным теллура с использованием метода дисковой диффузии

Теллуторганические соединения (ТОС)	<i>E. coli</i>
Вещество 1 Диоксисироцикло-[4-метилфенил] теллурахлорид	14,27 (0,12)
Вещество 2 3-Хлорметилдиоксинироциклофенилтеллурахлорид	13,83 (0,15)
Вещество 3 Этилтеллуробензаль-[2-метокси-3,5-дихлор] анилин	12,6 (0,41)

Примечание: приведены средние значения для трех повторов, в скобках указаны значения стандартного отклонения, показывающие, насколько разбросаны значения в выборке относительно среднего значения.

Диско-диффузный метод определения чувствительности к антибиотикам культуры *E. coli* показал, что в результате действия антибиотиков наибольшую биологическую активность проявил цефтриаксон, со средним значением 19,79 мм. На втором месте по эффективности оказался цефотаксим, со средним значением зоны ингибирования 18,74 мм. Менее эффективным из коммерческих препаратов оказался цефазолин. Зона ингибирования роста культуры кишечной палочки составила 12,73 мм.

Результаты по определению чувствительности бактерий к ТОС диско-диффузионным методом представлены в табл. 2.

В таблице приведены данные при бактериальной нагрузке $1,5 \times 10^8$. Зона подавления роста микроорганизмов варьирует от 12 до 14,5 мм. Сравнительный анализ показал, что эти значения находятся на уровне чувствительности к коммерческим дискам, содержащим различные антибиотики, но высокая токсичность производных теллура и растворимость только в ДМСО уменьшает их привлекательность в качестве потенциальных антибактериальных средств.

Влияние фитонцидов лука репчатого (Allium cepa), чеснока (Allium sativum) и лимона (Citrus limon) на рост и развитие колоний микроорганизмов

Для определения воздействия лука, лимона и чеснока на рост колоний бактерий были исследованы посеы смывов с грязных рук. Для этого смывы с рук наносили на питательную среду в чашки Петри. В центр чашек поместили мелко нарезанные лук, чеснок и лимон. Через 2–3 дня оценили результат опыта. Результаты опыта показали, что колонии микроорганизмов появились во всех пробах, кроме пробы с чесноком (рис. 1). В чашке с лимоном микробы появились только по краям, а в чашке с луком – по всей поверхности. По всей видимости, чеснок является самым мощным противомикробным средством.

Биологические свойства гетероциклических производных теллура и их зависимость от присоединенной группировки были описаны ранее [7], данные соединения отличаются тем, что введены новые группировки. Все теллуторганические вещества прошли проверку биологических свойств на системе PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). В данной серии опытов также были изучены все три гетероциклических соединения:

1) диоксисироцикло-[4-метилфенил]теллурахлорид (вещество 1);

2) 3-хлорметилдиоксисироциклофенилтеллурахлорид (вещество 2);

3) этилтеллуробензаль-[2-метокси-3,5-дихлор]анилин (вещество 3).

Вещества были разведены в пяти концентрациях с учетом их цитотоксичности. Цитотоксичность для данных соединений была определена в предварительных опытах на перевиваемой линии клеток зеленой мартышки (Vero) на 1 (ОЦД₅₀) и 3 (ЦД₅₀) сутки после обработки монослоя клеток различными концентрациями исследуемых веществ. Исходя из проведенных расчетов, для эксперимента были подготовлены диски, на которые были нанесены следующие концентрации исследуемых веществ:

Вещество 1 – диоксисироцикло-[4-метилфенил]теллурахлорид (ОЦД₅₀ = 13,5 мкг; в 10 больше, 135 мкг; в 2 больше, 27 мкг; в 2 меньше, 6,75 мкг; в 10 меньше, 1,35 мкг).

Вещество 2 – 3-хлорметилдиоксисироциклофенилтеллурахлорид (ОЦД₅₀ = 1,2 мкг; в 10 больше, 12 мкг; в 2 больше, 2,4 мкг; в 2 меньше, 0,6 мкг; в 10 меньше, 0,12 мкг).

Вещество 3 – этилтеллуробензаль-[2-метокси-3,5-дихлор]анилин (ОЦД₅₀ = 2 мкг; в 10 больше, 20 мкг; в 2 больше, 4 мкг; в 2 меньше, 1 мкг; в 10 меньше, 0,2 мкг).



Рис. 1. Сравнительный анализ активности производных теллура на культуру кишечной палочки

Действие веществ изучалось при различной бактериальной нагрузке, но видимый эффект был выявлен только при бактериальной нагрузке $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что приблизительно соответствует 0,5 по стандарту Макфарланда и меньше. На рис. 2 показана степень подавления образования колоний *E. coli* при концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл в чашке Петри через 24 ч производными теллура, в присутствии коммерческих антибиотиков и при обработке ДМСО.

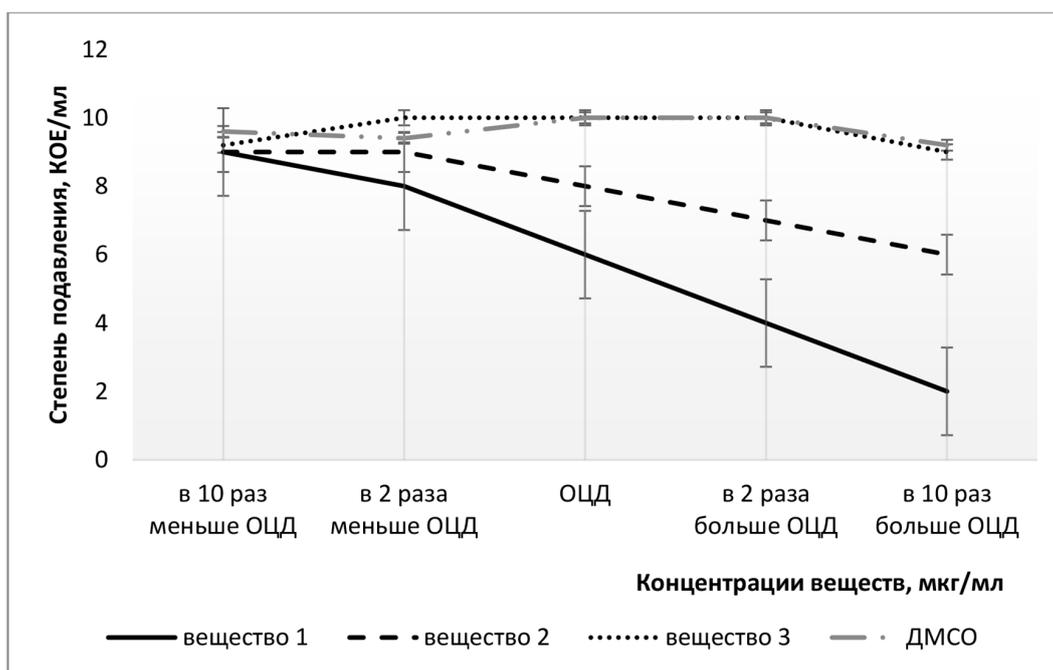


Рис. 2. Чувствительность *E. coli* к производным теллура при концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл

Из изученных трех соединений первое вещество подавляло количество колоний на 80 %, а второе – на 40 %. При этом надо отметить, что размеры колоний также были относительно маленькими по сравнению с колониями в контрольной чашке. Вещество 3 – этилтеллуробензаль-[2-метокси-3,5-дихлор] анилин антибактериального эффекта в отношении данного микроба не имело.

Заключение

В ходе исследования изолированная культура *E. coli* была изучена при воздействии веществ, обладающих потенциальным антибактериальным эффектом, и показана различная чувствительность культуры к данным веществам. Вероятно, это связано с различиями в строении присоединенных радикалов. Изучение антибактериального эффекта веществ 2 и 3 (3-хлорметилдиоксинироциклофенилтеллур хлорида и этилтеллуробензаль-[2-метокси-3,5-дихлор] анилина) не выявило эффективности этих соединений в отношении культур бактерий *E. coli*. Воздействие природных антибиотиков (лук, чеснок, лимон) на микрофлору грязных рук показало, что самым эффективным из них является чеснок.

Список литературы

1. Vávrová S., Struhárnanská E., Turna J., Stuchlík S. Tellurium: A Rare Element with Influence on Prokaryotic and Eukaryotic Biological Systems // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. № 5924. DOI: 10.3390/ijms22115924.
2. Abudawood M., Alnuaim L., Tabassum H., Ghneim H.K., Alfihli M.A., Alanazi S.T., Alenzi N.D., Alsobaie S. An Insight into the Impact of Serum Tellurium, Thallium, Osmium and Antimony on the Antioxidant/Redox Status of PCOS Patients: A Comprehensive Study // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24 (3). P. 2596. DOI: 10.3390/ijms24032596.
3. Bamunusinghage N.P.D., Neelawala R.G., Magedara H.P., Ekanayaka N.W., Kalupahana R.S., Silva-Fletcher A., Kottawatta S.A. Antimicrobial Resistance Patterns of Fecal *E.coli* in Wildlife, Urban Wildlife, and Livestock in the Eastern Region of Sri Lanka, and Differences between Carnivores, Omnivores, and Herbivores // *J Wildl Dis.* 2022. Vol. 58, Is. 2. P. 380–383.
4. Galindo-Méndez M. Antimicrobial Resistance in *E. coli* // *E. Coli Infections – Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment* // *IntechOpen.* Sep. 30. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.93115.
5. Jeje O., Ewunkem A.J., Jeffers-Francis L.K., Graves J.L. Jr. Serving Two Masters: Effect of *E.coli* Dual Resistance on Antibiotic Susceptibility // *Antibiotics (Basel).* 2023. Vol. 13, Is. 3. P. 2–8.
6. Nuzhdina A.V., Morozov A.S., Kopitsyna M.N., Strukova E.N., Shlykova D.S., Bessonov I.V., Lobakova E.S. Simple and versatile method for creation of non-leaching antimicrobial surfaces based on cross-linked alkylated polyethyleneimine derivatives // *Materials Science and Engineering. C.* 2017. Vol. 70. P. 788–795. DOI: 10.1016/j.msec.2016.09.033.
7. Адиева А.А., Климова Р.Р., Абакаров Г.М., Меджидова М.Г., Джамалова С.А., Омарова Д.К., Меджидов М.А. Изучение биологических свойств теллуросодержащих гетероциклических соединений // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2021. № 10. С. 7–11.