**DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.3(47).186592**

УДК 619:614.31:631.57:637:636.085

**Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, М.А. Васильєв, І.П. Метеліцина**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

# СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ІЗОЛЬОВАНИХ З ЧОРНОМОРСЬКИХ ГУБОК, ДО АНТИБІОТИКІВ І ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

***Метою** роботи є визначення ступеня стійкості до антибіотиків і важких металів молочнокислих бактерій, виділених з чорноморських губок роду Haliclona sp. **Методи**. Класичні мікробіологічні методи використовували для вивчення культуральних і біохімічних характеристик ізольованих штамів, що за сукупними показниками дозволило віднести ізольовані штами до роду Lactobacillus. Ідентифікацію до виду здійснювали за спектром жирних кислот з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock методом газової хромотографії. На підставі отриманих результатів штами ідентифікували до видів Lactobacillus vaccinostercus, Lactobacillus parabuchneri і Lactobacillus bifermentans. Стійкість до важких металів визначали методом реплік, а резистентність до антибіотиків – диско-дифузійним методом. Графічне опрацювання даних проводили за програмою Microsoft Excel та R 3.4.0. **Результати**. За результатами дослідження показано, що більшість штамів молочнокислих бактерій були стійкими до канаміцину (95,2%), цефалексину (71,4%), цефазоліну (57,1%), левофлоксацину (71,4%), бензилпеніциліну (85,7%), оксациліну (76,2%), фугарину (76,2%). Серед штамів, які володіли множинною резистентністю, були L. bifermentans 8a, L. bifermentans $10_2$, L. bifermentans $19_{2a}$, L. parabuchneri $19_{2b}$ і L. bifermentans $38_{2a}$. Штами L. bifermentans 8a, L. parabuchneri $10_1$, L. parabuchneri $15_{2a}$, L. bifermentans $19_{2a}$, L. parabuchneri $19_{2b}$, L. vaccinostercus $22_1$ володіли резистентністю до нікелю, цинку та кобальту в концентрації 10 mM, 10 mM і 5 mM, відповідно. Штами L. bifermentans $15_{1b}$ і L. parabuchneri $25_2$ володіли резистентністю до міді, кадмію і ртуті. **Висновки**. На основі отриманих даних показано, що більшість досліджених чорноморських штамів молочнокислих бактерій, ізольованих з губок володіють природною резистентністю до антибіотиків та важких металів.*

*Ключові слова: Чорне море, Haliclona sp., Lactobacillus, резистентність, антибіотики, важкі метали.*

Молочнокислі бактерії активно використовуються для створення корисних і потенційно безпечних для здоров'я людини продуктів харчування. Однак у зв'язку з поширенням ринку пробіотиків виникла проблема мікробної стійкості до лікарських препаратів у даної групи мікроорганізмів.

Оскільки пробіотичні бактерії додаються в різні види продуктів, вони є

© Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, М.А. Васильєв, І.П. Метеліцина, 2019

потенційним джерелом поширення генів стійкості до антибіотиків і хоча більшість продуктів харчування, які асоційовані з молочнокислими бактеріями, набули статусу «Generally Regarded As Safe» (GRAS), потенційний ризик для здоров'я через перенесення генів стійкості до антибіотиків від штамів молочнокислих бактерій до бактерій резидентної мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини і, отже, до патогенних бактерій, зберігається.

Без сумніву, механізми поширення набутої стійкості до антибіотиків з'явилися задовго до використання антибіотиків. Придбаними детермінантами стійкості, в першу чергу, володіли продуценти антибіотиків, які мають механізм захисту від своїх же антимікробних метаболітів, а найбільш активні генетичні чинники стійкості кодуються в плазмідах, транспозонах і хромосомі, що полегшило горизонтальний перенос і забезпечило широке поширення чинників стійкості між мікроорганізмами.

Раніше вважалося, що збільшення резистентності до антибіотиків було наслідком широкого застосування антибіотиків в терапії та сільському господарстві [18, 21], однак зараз існує думка, що резистентність до антибіотиків виникає не лише від неправильного або надмірного використання антибіотиків [6, 9, 19]. Так, багатьма дослідниками показано, що стійкість до антибіотиків може також формуватися під впливом забруднення важкими металами [19, 24, 28].

Наприклад, було показано, що існує колінеарність між концентрацією в навколишньому середовищу металів (алюмінію, міді, марганцю, нікелю, ванадію і цинку) і рівнем експресії таких генів як blaCTX, blaOXA, blaTEM, tet4series, tetM, tetW, sul1andsul2 [19, 24].

Amanpreet et al. [5] повідомили, що кадмій і цинк можуть стимулювати спільний відбір на стійкість до метициліну у *S. aureus* за допомогою горизонтального переносу плазмід, що містять гени, як для стійкості до метициліну, так і до металів (mec і czr).

Швидше за все, можна вважати, що мікробні популяції реагують на стрес, викликаний присутністю токсичних речовин, розвитком систем самозахисту, а навколишнє середовище діє як біореактор, що містить генетичні ознаки стійкості і хімічні стресори [4, 5, 7, 8].

Метою даного дослідження було визначення стійкості до антибіотиків і важких металів молочнокислих бактерій виділених з чорноморських губок роду Haliclona sp.

**Матеріали та методи**

Бактерії були ізольовані з морських губок *Haliclona* sp. (Order Haplosclerida, Demospongiae), зібраних за допомогою легководолазного обладнання на глибині 5–6 м в Одеській затоці Чорного моря (Малий Фонтан) на відстані 300–400 м від берега у вересні 2017 року.

Зразки губок транспортували до лабораторії у контейнері об'ємом 10 л з морською водою протягом до 3 год. Отримані зразки тричі промивали морською водою, яку попередньо автоклавували, для відділення сміття і неасоційованих мікроорганізмів. Потім поверхню губки стерилізували швидким промиванням 70% етанолом і негайно занурювали в автоклавовану морську

воду. Для безпосереднього виділення асоційованих мікроорганізмів з губок, зразки кожної губки витягували з води, поміщали в стерильну чашку Петрі і стерильними ножицями поділяли на рівні фрагменти. Отримані фрагменти губки (приблизно 1 г) гомогенізували механічним способом в 5,0 мл стерильного сольового розчину (3% NaCl в дистильованій воді). Гомогенат серійно розводили, починаючи з 100 мкл гомогенату в 900 мкл стерильної води до отримання остаточного розведення $10^{-4}$ від початкової концентрації. Потім 100 мкл кожного розведення висівали на щільне середовище MRS для виділення молочнокислих бактерій. Культивування проводили в термостаті при температурі 37,0±0,5 °С протягом 48–72 год. Виділені бактеріальні колонії відбирали і знову пересівали на середовище MRS до отримання чистих культур.

Ідентифікацію до роду проводили на підставі основних морфологічних, культуральних і біохімічних тестів [2]. Видову ідентифікацію штамів проводили за складом жирних кислот клітинних ліпідів з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) з капілярною колонкою ULTRA-2 (25мм × 0,2 мм × 0,33мкм) і полум'яно-йонізаційним детектором [1].

Резистентність до йонів важких металів вивчали до солей міді ($CuSO_4 \times 7H_2O$), кадмію ($CdSO_4 \times H_2O$), кобальту ($CoSO_4 \times 5H_2O$), цинку ($ZnSO_4 \times 6H_2O$), нікелю ($Ni(NO_3)_2 \times 6H_2O$) і ртуті ($Hg(NO_3)_2$ (дослід) і без них (контроль). В досліді використовували концентрації – 100 mM, 10 mM, 5mM, 1 mM, 0,5 mM і 0,01M, що додавали до середовища MRS.

Для визначення мінімальної пригнічувальної концентрації (МІК) використовували метод реплік, що дозволило отримати ідентичні відбитки колоній на чашках Петрі з різними концентраціями металів.

Для визначення рівня резистентності до антибіотиків серед ізолятів використовували диско-дифузійний метод. Досліджували антибіотики, які входили до груп макролідів, аміноглікозидів, цефалоспоринів, хінолонів, пеніцилінів, амфеніколів, тетрациклінів та рифампіцинів (концентрація антибіотика у дисках наведена у таблиці 1). За розміром зони пригнічення росту (мм) всі штами поділяють на чутливі, проміжні і стійкі до даного антибіотика, згідно з рекомендацією EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [14].

Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю $p < 0,05$.

Графічне опрацювання даних проводили за програмою Microsoft Excel та R 3.4.0.

**Результати та їх обговорення**

За результатами дослідження вивчені штами були віднесені до *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus parabuchneri* і *Lactobacillus bifermentans*. На підставі отриманих даних побудована дендрограма для візуалізації ступеня спорідненості між штамами (рис. 1) на підставі складу жирних кислот клітинних ліпідів. Отримані результати свідчать, що незважаючи

на деяку варіабельність у складі жирних кислот, при зведенні даних отримано підтвердження високого рівня подібності між штамами, які при ідентифікації були віднесені до одного виду.

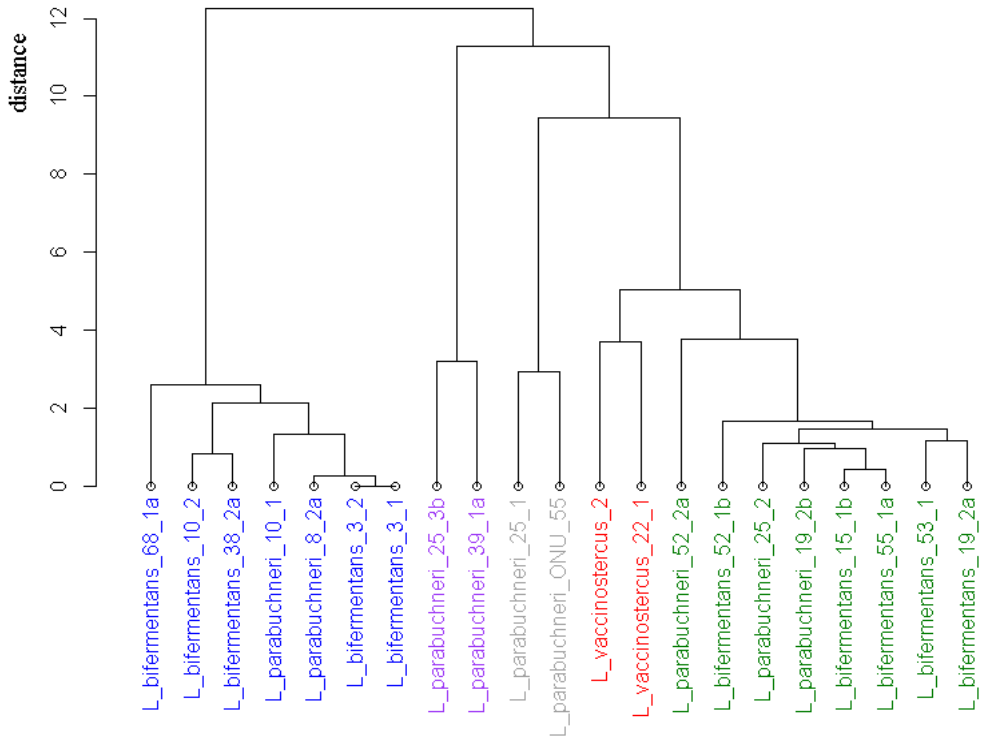


**Рис. 1. Дендрограма спорідненості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp., за складом жирних кислот клітинних ліпідів**

**Fig. 1. Relationship dendrograma of studied *Lactobacillus* strains isolated from *Haliclona* sp. sponges based on the fatty acid composition of cell lipids**

Проведені дослідження показали, що більшість молочнокислих бактерій стійкі до одного або кількох антибіотиків, причому багато штамів продемонструвало властивість множинної стійкості до антибіотиків. У таблиці 1 наведено зведені показники стійкості молочнокислих бактерій до антибіотиків, на підставі визначення рівня природної резистентності [14].

Як видно даних з табл. 1, майже усі штами молочнокислих бактерій стійкі до канаміцину (аміноглікозиди), який використовують в основному при лікуванні кишкових інфекцій, тому стійкість пробіотичних культур до цього антибіотика досить важлива. Чутливим до канаміцину виявився штам *L. parabuchneri* $52_{2b}$. До іншого аміноглікозиду – стрептоміцину, були стійкими 23,8% досліджених штамів (табл. 1). Серед найбільш чутливих до цього антибіотика виявилися штами *L. bifermentans* $3_2$, *L. bifermentans* $52_{2a}$ і *L. parabuchneri* $52_{2b}$. Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які показали, високу стійкість лактобацил до аміноглікозидних антибіотиків [10, 13], що може бути пов'язано з низькою проникністю аміноглікозидів через мембрани лактобацил.

Таблиця 1

**Інтерпретація значень діаметрів зон затримки росту при визначенні чутливості лактобацил до антибіотиків диско-дифузійним методом**

Table 1

**Interpretation of the diameters of the growth inhibition zones in determining the sensitivity of lactobacilli to antibiotics by the disk-diffuse method**

| Група антибіотиків | Антибіотик | Вміст антибіотика в диску (мкг) | Діаметр зон пригнічення росту (мм) згідно EUCAST [14] | | | % штамів | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | стійкі | проміжні | чутливі | стійкі | проміжні | чутливі |
| Макроліди | Кларитроміцин | 15 | ≤ 10 | 11-20 | ≥21 | 0,0 | 47,6 | 52,4 |
| | Азитроміцин | 15 | ≤ 13 | 14-17 | ≥18 | 9,5 | 57,1 | 33,3 |
| | Еритроміцин | 15 | ≤13 | 14-22 | ≥23 | 0,0 | 80,9 | 19,1 |
| Аміноглікозиди | Стрептоміцин | 300 | ≤14 | 15-19 | ≥20 | 23,8 | 61,9 | 14,3 |
| | Нетилміцин | 10 | ≤ 12 | 13-15 | ≥15 | 0,0 | 42,9 | 57,1 |
| | Канаміцин | 30 | ≤10 | 11-20 | ≥21 | 95,2 | 0,0 | 4,8 |
| Цефалоспорини | Цефалексін | 5 | ≤19 | 20-24 | ≥25 | 71,4 | 19,1 | 9,5 |
| | Цефіксим | 5 | ≤15 | 16-18 | ≥19 | 47,6 | 28,6 | 23,8 |
| | Цефазолин | 30 | ≤16 | 17-21 | ≥22 | 57,1 | 14,3 | 28,6 |
| Фторхінолони III покоління | Левофлоксацин | 5 | ≤19 | 20-24 | ≥25 | 71,4 | 23,8 | 4,8 |
| Пеніциліни | Ампіцилін | 2 | ≤10 | 11-20 | ≥21 | 4,8 | 28,6 | 71,4 |
| | Бензилпеніцилін | 1 ЕД | ≤16 | 17-21 | ≥22 | 85,7 | 4,8 | 9,5 |
| | Оксацилін | 1 | ≤8 | 9-13 | ≥14 | 76,2 | 9,5 | 14,3 |
| Нітрофурани | Фурагін | 100 | ≤17 | 18-22 | ≥23 | 76,2 | 9,5 | 14,3 |
| Амфеніколи | Левоміцетин (хлорамфенікол) | 30 | ≤11 | 12-17 | ≥18 | 9,5 | 28,6 | 61,9 |
| Тетрацикліни | Тетрациклін | 30 | ≤14 | 15-18 | ≥19 | 23,8 | 71,4 | 4,8 |
| Рифампіцини | Рифампіцин | 5 | ≤15 | 16-20 | ≥21 | 19,1 | 47,6 | 33,3 |

Інша ситуація спостерігається при дослідженні стійкості молочнокислих бактерій до нетилміцину (57,1% чутливих штамів), який також належить до групи аміноглікозидів. Найбільшу чутливість (> 20,0 мм) проявили штами *L. bifermentans* $3_1$, *L. parabuchneri* $52_{2b}$ і *L. bifermentans* $15_{1b}$. Інші штами були меш чутливими (табл. 2).

Згідно M. Danielsen і A. Wind [13] бактерії роду *Lactobacillus*, зазвичай, чутливі до пригнічувачів біосинтезу білка (крім деяких аміноглікозидів, як було показано раніше). Отримані нами результати перегукуються з даними інших дослідників [10].

Серед макролідів найбільшу бактеріостатичну активність мали кларитроміцин і еритроміцин, до яких стійких штамів молочнокислих бактерій не було виявлено (табл. 1 і 2). До азитроміцину стійкими виявилися лише штами *L. bifermentans* $19_{2a}$ і *L. parabuchneri* $19_{2b,}$ що склало 9,5% усіх досліджених штамів (табл. 1 і 2).

Серед досліджених штамів стійкими до левоміцетину були лише 9,5% (*L. bifermentans* $19_{2a}$, *L. parabuchneri* $19_{2b}$). Можливим поясненням щодо отриманих даних може бути те, що при ефективності відносно багатьох грампозитивних і грамнегативних бактерій, та штамів бактерій, які є стійкими до пеніциліну, стрептоміцину, сульфаніламідів, левоміцетин слабо активний відносно кислотостійких бактерій.

До тетрацикліну стійкими були 23,8% штамів, серед яких *L. bifermentans* $3_2$, *L. bifermentans* 8a, *L. bifermentans* $15_{1b}$, *L. parabuchneri* $25_2$, *L. bifermentans* $38_{2a}$. (табл. 1 і 2).

Наявність стійких штамів можна пояснити широким розповсюдженням завдяки горизонтальному переносу генів стійкості до хлорамфеніколу (catA, cat), еритроміцину (erm(B), erm(B)-1, erm(C) і тетрацикліну (tet(M), tet(K), tet(W)) [16, 17].

До рифампіцину стійкими виявилися 19,0% усіх досліджених штамів, серед яких *L. parabuchneri*$10_1$, *L. bifermentans* $10_2$, *L. bifermentans* $19_{2a}$ і *L. parabuchneri* $19_{2b}$ (табл. 1 і 2). Найбільшу стійкість досліджені штами проявили до групи цефалоспоринів. Так, до цефалексину стійкими були 71,4% досліджених штамів молочнокислих бактерій, до цефіксиму – 47,6% штамів, а до цефазоліну – 51,1% досліджених штамів молочнокислих бактерій (табл. 1 і 2).

Стійкими до левофлоксацину (група хінолонів) виявилися 71,4% штамів. Оскільки даний антибіотик активний проти низки умовно-патогенних мікроорганізмів, то його призначають при інфекціях нижніх дихальних шляхів, ЛОР-органів, сечовивідних шляхів і нирок, та при туберкульозі і хронічному простатиті, що і може слугувати причиною виникнення настільки високого рівня стійкості до цього препарату у молочнокислих бактерій, які мешкають у Чорному морі.

До антибіотиків групи пеніцилінів досліджені штами демонстрували різну стійкість. Так до бензилпеніциліну стійкими були 85,7% штамів, до ампіциліну – лише 4,7% усіх досліджених штамів, а до оксациліну стійкими виявилися 76,1% штамів (табл. 1 і 2). Отримані дані досить цікаві, бо взагалі відомо, що усі препарати групи пеніцилінів володіють високою антибактеріальною

Таблиця 2

**Розподіл штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp., за рівнем стійкості до антибіотиків**

Table 2

**Distribution by antibiotic resistance level of *Lactobacillus* strains isolated from *Haliclona* sp. sponges**

| Антибіотик | Стійкі | Чутливі | Проміжні |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Кларитроміцин | Немає | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$ | *L. bifermentans* $3_1$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $53_1$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Азитроміцин | *L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$<br>*L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$ | *L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $53_1$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Еритроміцин | Немає | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. bifermentans* $53_1$ | *L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Стрептоміцин | *L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$ | *L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. bifermentans* $10_2$ |

Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| | | | *L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Нетилміцин | Немає | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* $8_{2a}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | *L. parabuchneri*$10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$ |
| Канаміцин | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri*$10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | *L. parabuchneri* $52_{2b}$ | Немає |
| Цефалексин | *L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri*$10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$ | *L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$ |

Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| | *L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | | |
| Цефіксим | *L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$ | *L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Цефазолін | *L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$ |
| Левофлоксацин | *L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$ | *L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Ампіцилін | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$ | *L. bifermentans* $19_{2a}$ | *L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* $8_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$ |

Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| | *L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | | |
| Бензилпеніцилін | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$<br>*L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_1$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | *L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. parabuchneri* $25_{3b}$ |
| Оксацилін | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$<br>*L. bifermentans* $3_2$ | *L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_1$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Фурагін | *L. bifermentans* $3_1$<br>*L. bifermentans* $3_2$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. bifermentans* $10_2$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_1$<br>*L. parabuchneri* $25_1$<br>*L. parabuchneri* $25_2$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_2$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_1$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. parabuchneri* $10_1$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$ |
| Левоміцетин (хлорамфенікол) | *L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_1$ | *L. bifermentans* 8a<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$ |

Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| | | *L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. bifermentans* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Тетрациклін | *L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. bifermentans* 8a<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$ | *L. bifermentans* $53_{1}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |
| Рифампіцин | *L. parabuchneri* $10_{1}$<br>*L. bifermentans* $10_{2}$<br>*L. bifermentans* $19_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $19_{2b}$ | *L. vaccinostercus* 2<br>*L. bifermentans* $3_{1}$<br>*L. bifermentans* $3_{2}$<br>*L. parabuchneri* $25_{3b}$<br>*L. bifermentans* $38_{2a}$<br>*L. parabuchneri* $39_{1a}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2b}$ | *L. bifermentans* 8a<br>*L. bifermentans* $15_{1b}$<br>*L. parabuchneri* $15_{2a}$<br>*L. vaccinostercus* $22_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{1}$<br>*L. parabuchneri* $25_{2}$<br>*L. parabuchneri* $48_{2}$<br>*L. parabuchneri* $52_{2a}$<br>*L. bifermentans* $53_{1}$<br>*L. bifermentans* $55_{1a}$<br>*L. bifermentans* $68_{1a}$ |

активністю, однак до них досить швидко виробляється «імунітет» за рахунок ферменту пеніцилінази. В даному випадку отримані дані збігаються з результатами інших дослідників [17] і рівень резистентності, скоріш за все, залежать від присутності таких факторів, як гени blaZ, bla і mecA, що визначають стійкість до ампіциліну у молочнокислих бактерій [5, 17], або стійкість виникає за рахунок точкових мутацій в генах, що кодують білки, які зв'язують пеніцилін [26].

До дії фурагіну стійкими були 76,1% штамів молочнокислих бактерій. Чутливими виявилися штами *L. vaccinostercus* 2, *L. bifermentans* $15_{1b}$ і *L. parabuchneri* $52_{2b}$ (табл. 1 і 2).

Як видно з наведених даних, більшість штамів досліджених молочнокислих бактерій, ізольованих з морських губок, володіють множинною резистентністю до антибіотиків. У більшості випадків вони були стійкі до канаміцину, цефалексину, цефазоліну, цефіксиму, фурагіну і бензилпеніциліну.

Також деякі штами додатково стійкі до левофлоксацину, левоміцетину, ампіциліну, рифампіцину або тетрацикліну.

Серед досліджених штамів до максимальної кількості антибіотиків (від 7 до 9) були резистентними *L. bifermentans* 8a, *L. bifermentans* $10_2$, *L. bifermentans* $19_{2a}$, *L. parabuchneri* $19_{2b}$ і *L. bifermentans* $38_{2a}$. До меншої кількості антибіотиків (від 5 до 7) мали множинну резистентність *L. bifermentans* $3_2$, *L. parabuchneri* $10_1$, *L. bifermentans* $15_{1b}$, *L. vaccinostercus* $22_1$, *L. parabuchneri* $25_1$, *L. parabuchneri* $25_2$, *L. parabuchneri* $52_{2a}$, *L. bifermentans* $53_1$, *L. bifermentans* $55_{1a}$ і *L. bifermentans* $68_{1a}$.

При опису взаємодії металів з мікроорганізмами слід враховувати, що в багатьох випадках метали (наприклад, Cu, Fe, Mo, Mg), які є кофакторами ферментів необхідні для росту мікроорганізмів. Однак межа між поняттям «життєво необхідний» і токсичний в даному випадку залежить від концентрації металу. Мікроорганізми розробили кілька способів нівелювання загрози в разі надмірності металу в середовищі, які включають в себе відтік йонів металів, комплексоутворення, відновлення металів, причому досить часто ці способи активні і щодо деяких антибіотиків [5].

При дослідженні стійкості чорноморських лактобацил до важких металів було показано, що солі нікелю, цинку та кобальту майже не впливали на ріст цих бактерій.

Так, більшість штамів *Lactobacillus* були резистентними до нікелю ($Ni(NO_3)_2 \times 6H_2O$) при МІК 5 mM впродовж 24 годин інкубації на щільному середовищі MRS. Кількість штамів, що були життєздатними при цій концентрації нітрату нікелю, досягала 57,1%. При концентрації $Ni(NO_3)_2 \times 6H_2O$ 10 mM частка штамів, що демонстрували гарний ріст на щільному середовищі, складала 33,3% (рис. 2). Найбільш чутливими до дії нітрату нікелю виявилися штами *L. vaccinostercus* 2 і *L. bifermentans* $3_2$ (рис. 3).

В присутності солі цинку ($ZnSO_4 \times 6H_2O$) на 24 годину культивування 57,1% штамів росли при концентрації 10 mM для. В присутності 5 mM сульфату цинку росло 28,5% штамів. 14,5% штамів були більш чутливими до дії $ZnSO_4 \times 6H_2O$ і росли в присутності 1 mM солі цинку (рис. 2). Найбільш чутливими до дії сульфату цинку виявилися штами *L. parabuchneri* $25_{3b}$ і *L. parabuchneri* $39_{1a}$ (рис. 3).

На середовищі, до якого додавали сульфат кобальту ($CoSO_4 \times 5H_2O$) в концентрації 5 mM, після 24 год культивування виросло 76,1% усіх досліджених штамів молочнокислих бактерій. При концентрації 1 mM сульфата кобальту виросло 23,8% штамів, серед яких штами *L. vaccinostercus* 2, *L. bifermentans* $3_1$, *L. bifermentans* $3_2$, *L. parabuchneri* $25_1$ і *L. parabuchneri* $48_2$ (рис. 3).

Найбільш різноманітно досліджені штами реагували на присутність сульфату міді ($CuSO_4 \times 7H_2O$) у середовищі. Так, більшість штамів (57,1%) росли при концентрації 0,5 mM, 14,2% штамів росли при концентрації 1 mM і 23,8% росли при 5 mM (рис. 3).

При внесенні у середовище MRS сульфата кадмію ($CdSO_4 \times H_2O$) спостерігали ріст мінімальної кількості штамів (14,2%) при концентрації солі 0,1 mM (рис. 2). Найбільш резистентними до дії кадмію виявилися штами *L. bifermentans* $15_{1b}$, *L. parabuchneri* $25_1$ і *L. parabuchneri* $25_2$ (рис. 3).

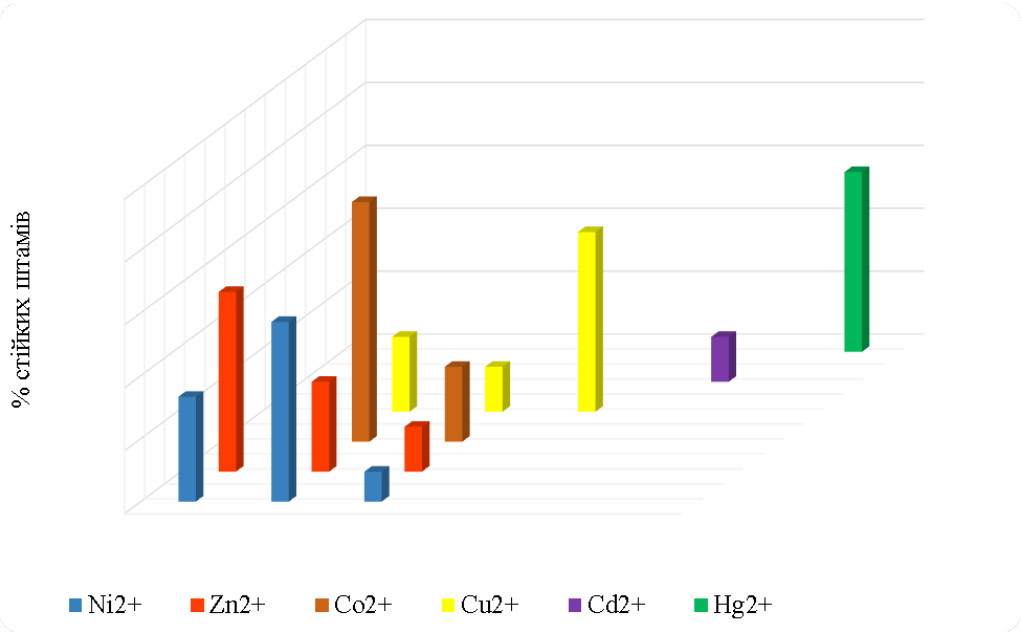


**Рис. 2. Частка стійких штамів молочнокислих бактерій до різних концентрацій важких металів**

**Fig. 2. Proportion of lactic acid bacteria strains resistant to different concentrations of heavy metals**

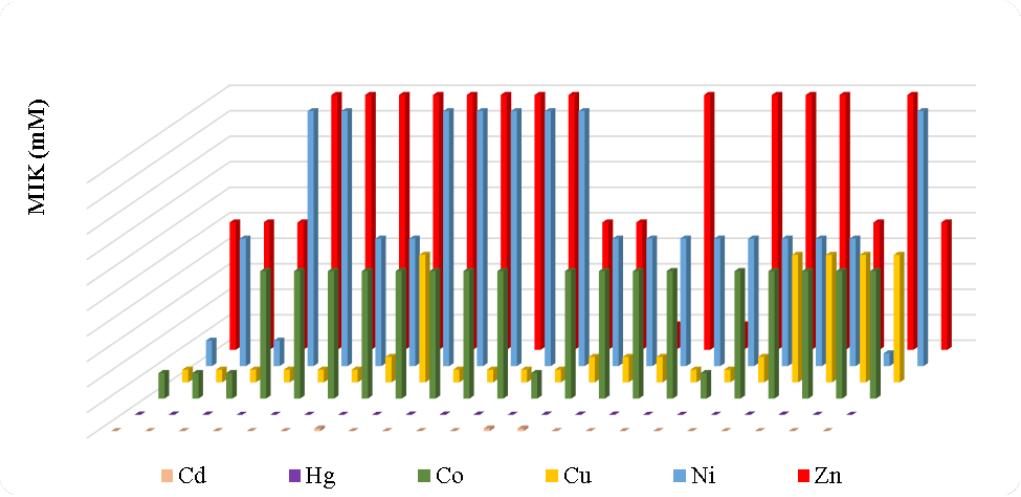


**Рис. 3. Індивідуальна чутливість штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp., до дії важких металів**

**Fig. 3. Sensitivity of individual *Lactobacillus* strains isolated from *Haliclona* sp. sponges to heavy metals action**

До нітрату ртуті в концентрації 0,01mM були стійкими 57,1% усіх досліджених штамів молочнокислих бактерій (рис. 2 і 3).

Аналізуючи резистентність штамів молочнокислих бактерій до важких металів можна відзначити, що вони діляться на дві групи. До першої входять штами, які є стійкими до нікелю, цинку та кобальту. До другої групи входять штами які є стійкіми до кадмію і ртуті. До першої групи відносяться: *L. bifermentans* 8a, *L. parabuchneri* $10_1$, *L. parabuchneri* $15_{2a}$, *L. bifermentans* $19_{2a}$, *L. parabuchneri* $19_{2b}$, *L. vaccinostercus* $22_1$, до другої групи – *L. bifermentans* $15_{1b}$ і *L. parabuchneri* $25_2$. Саме ці штами також були стійкими до міді (рис. 3).

Слід відмітити, що для більшості штамів, які мали резистентність до важких металів показана висока множинна резистентність до антибіотиків.

В результаті проведених досліджень показано, що штами молочнокислих бактерій, ізольовані з чорноморських губок, за своїми спектрами стійкості до антибіотиків не у всіх випадках співпадають з даними літератури, щодо молочнокислих бактерій, ізольованих з більш звичних джерел – кисломолочних та ферментованих продуктів.

Так, відомо, що штами молочнокислих бактерій чутливі до бензилпеніциліну, еритроміцину, хлорамфеніколу і тетрацикліну [3, 11, 12]. Однак, досліджені чорноморські штами виявилися стійкими до бензилпеніциліну і показали проміжну стійкість до еритроміцину і тетрацикліну (табл. 1). Рівень резистентності до хлорамфеніколу чорноморських штамів відповідає даним літератури [3, 11, 12, 25].

Рівень стійкості досліджуваних штамів молочнокислих бактерій до аміноглікозидів (табл. 1) збігається з іншими дослідженнями по стійкості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з молочнокислих продуктів харчування, до цієї групи антибіотиків [13, 16, 27].

Відповідно, згідно з даними літератури [10, 11, 17, 22] бактерії з ферментованих продуктів харчування, шлунково-кишкового тракту людини високочутливі до рифампіцину, а бактерії, ізольовані з чорноморських губок, показали проміжний рівень чутливості до цього антибіотика (табл. 1).

При порівнянні літературних і власних даних по стійкості молочнокислих бактерій до β-лактамів було підтверджено, що молочнокислі бактерії більш стійкі до ампіциліну ніж до бензилпеніциліну [20, 23]. Поясненням цього явища може слугувати виникнення точкових мутацій в генах, що кодують білки, які зв'язують пеніцилін [26], або присутності таких чинників як гени blaZ, bla і mecA [5,17]. Одночасно було показано, що штами молочнокислих бактерій, ізольовані з чорноморських губок, виявилися більш стійкими до дії цефалоспоринів (табл. 1), що не співпадає з даними літератури [15, 16].

Аналізуючи результати стійкості досліджених штамів до солей важких металів показано, що вони були більш стійкими до дії солей важких металів, ніж штами, які були ізольовані з продуктів харчування і описані в літературі [5]. Так, більшість чорноморських штамів зберігали життєздатність при концентрації солей важких металів від 10 mM до 0,5 mM (рис.1 і 2), в той час як наведені в літературі дані [5] свідчать, що більшість молочнокислих бактерій здатна рости при концентрації від 0,07 mM до 0,6 mM в залежності від солі

металу. Мінімальна пригнічувальна концентрація співпадала тільки для солі кадмію – 0,1 mM (рис.1 і 2).

Таким чином, в результаті наших досліджень показано, що штами молочнокислих бактерій, ізольовані з чорноморських губок, були стійкими до аміноглікозидів, деяких β-лактамів, цефалоспоринів і солей важких металів (зокрема міді, нікелю, цинку, кобальту).

**Н.Ю. Васильева, И.В. Страшнова, М.А. Васильев, И.П. Метелицина**
Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел: .:+38 (0482) 68 79 64; e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

## УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЧЕРНОМОРСКИХ ГУБОК К АНТИБИОТИКАМ И ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

***Целью*** *работы является определение степени устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам молочнокислых бактерий, выделенных из черноморских губок рода Haliclona sp.* ***Методы****. Классические микробиологические методы использовали для изучения культуральных и биохимических характеристик изолированных штаммов, что по совокупным показателям позволило отнести изолированные штаммы к роду Lactobacillus. Видовую принадлежность осуществляли на основании анализа спектра жирных кислот методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA).На основании полученных результатов штаммы идентифицировали как Lactobacillus vaccinostercus, Lactobacillus parabuchneri и Lactobacillus bifermentans. Устойчивость к тяжелым металлам определяли методом реплик, а резистентность к антибиотикам - диско-диффузным методом. Графическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel и R 3.4.0.* ***Результаты****. По результатам исследований показано, что большинство штаммов молочнокислых бактерий были устойчивыми к канамицину (95,2%), цефалексину (71,4%), цефазолину (57,1%), левофлоксацину (71,4%), бензилпенициллину (85,7 %), оксациллину (76,2%), фугарину (76,2%). Среди штаммов, которые обладали резистентностью к нескольким антибиотикам были L. bifermentans* $8_a$*, L. bifermentans* $10_2$*, L. bifermentans* $19_{2a}$*, L. parabuchneri* $19_{2b}$ *и L. bifermentans триста восемьдесят второй. Штаммы L. bifermentans 8a, L. parabuchneri*$10_1$*, L. parabuchneri* $15_{2a}$*, L. bifermentans* $19_{2a}$*, L. parabuchneri* $19_{2b}$*, L. vaccinostercus* $22_1$ *характеризовались резистентностью к никелю, цинку и кобальту в концентрации 10 mM, 10 mM и 5 mM соответственно. Штаммы L. bifermentans* $15_{1b}$ *и L. parabuchneri* $25_2$ *обладали резистентностью к меди, кадмию и ртути.* ***Выводы****. На основании полученных данных показано, что большинство исследованных черноморских штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из губок обладают естественной резистентностью к антибиотикам и тяжелым металлам.*

*Ключевые слова: Черное море, Haliclona sp., Lactobacillus, резистентность, антибиотики, тяжелые металлы.*

**N.Yu. Vasylieva, I.V. Strashnova, M.A. Vasyliev, I.P. Metelitsyna**
Odesa I.I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.:+38 (0482) 68 79 64, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

# RESISTANCE OF *LACTOBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM THE BLACK SEA SPONGES TO ANTIBIOTICS AND HEAVY METAL

**Summary**

***The aim*** *of this work was determining the degree of resistance to antibiotics and heavy metals of lactic acid bacteria isolated from the Black Sea sponges of the genus Haliclona sp.* ***Methods****. The classical microbiological methods were used to study the cultural and biochemical characteristics of the isolated strains. According to the total obtained indices, the isolated strains were assigned to the genus Lactobacillus. Identification to the species was carried out by the spectrum of fatty acids using an automatic microorganism identification system MIDI Sherlock by gas chromatography. Based on the obtained results, the strains were identified as Lactobacillus vaccinostercus, Lactobacillus parabuchneri and Lactobacillus bifermentans. To determine resistance to heavy metals, the replica method was used, and to determine antibiotic resistance, it was used disco-diffuse method.* ***Results****. According to the results of the study, it was shown that most strains of lactic acid bacteria were resistant to kanamycin (95.2%), cephalexin (71.4%), cefazolin (57.1%), levofloxacin (71.4%), benzylpenicillin (85.7 %), oxacillin (76.2%), fugarin (76.2%). Among the strains resistant to several antibiotics there were L. bifermentans 8a, L. bifermentans* $10_2$*, L. bifermentans* $19_{2a}$*, L. parabuchneri* $19_{2b}$ *i L. bifermentans* $38_{2a}$*. The strains of L. bifermentans 8a, L. parabuchneri*$10_1$*, L. parabuchneri* $15_{2a}$*, L. bifermentans* $19_{2a}$*, L. parabuchneri* $19_{2b}$*, L. vaccinostercus* $22_1$ *were resistant to nickel, zinc and cobalt at concentration of 10 mM, 10 mM and 5 mM, respectively. The strains of L. bifermentans* $15_{1b}$ *and L. parabuchneri* $25_2$ *were resistant to copper, cadmium and mercury.* ***Conclusions****. Based on the obtained data, it was shown that most of the lactic acid bacteria strains that were isolated from the Black Sea sponges of the genus Haliclona sp. were resistant to antibiotics and heavy metals.*

*Key words: Lactobacillus, resistance, antibiotics, heavy metals.*

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Остапчук А.М.* Молекулярно-біологічна характеристика и ідентифікація штаму *Bacillus sp*. ONU14 з ентомопатогенною активністю// Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 6–13.

2. *Хоулт Дж., Криг Н., Снит П.* Определитель бактерий Берджи. –Изд: Мир,1997. – 800 с.

3. *Abriouel H., Casado Muñoz M.D.C., Lavilla Lerma L., Pérez Montoro B.,* et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. //Food Res Int. – 2015. – Vol. 78. – P. 465–481.

4. *Alonso A., Sanchez P., Martinez J.L.* Environmental selection of antibiotic resistance genes.// Environ Microbiol . – 2001. – Vol. 3. – P. 1–9.

5. *Amanpreet K. Sidhu, Gauri J.Metkar, Sweta P.Nandurikar, Sucheta N.Patil* An investigation on metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strains isolated from two different drinking water sources//Int.J.Curr.Microbiol. App.Sci. – 2015. – Vol.4, No. 2. – P. 305–313.

6. *Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V*. Co-selection of antibiotic and metal resistance.// Trends Microbiol. – 2006. – Vol. 14. – P. 176–182.

7. *Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K.* SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. //Nature. – 2004. – Vol. 427. – P. 72–74.

8. *Berendock T.U., Manaia C.M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E.*, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. //Nat Rev Microbiol. – 2015. – Vol. 13. – P. 310–317.

9. *Berg J., Thorsen M.K., Holm P.E., Jensen J., Nybroe O., Brandt K.K.* Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. //Environ Sci Technol. – 2010. – Vol. 44. – P. 8724–8728.

10. *Botina S.G., Poluektova E.U., Glazova A.A., Zakharevich N.V., Koroban N.V,* et al. Antibiotic resistance of potential probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* from human gastrointestinal microbiome. //Microbiology. –2011. – Vol. 80. – P. 175–183.

11. *Campedelli I., Mathur H., Salvett E.* Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp.// Applied and Environmental Microbiology/ – 2019. – Vol. 85, No. 1. – Article number: e01738-18

12. *Casado Munos M. C., Benomar N., Lerma L.L., Gálvez A.,* et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. //Int J Food Microbiol. – 2014. – Vol. 172. – P. 110–118.

13. *Danielsen M., Wind A.* Susceptibility of *Lactobacillus spp*. to antimicrobial agents. //Int J Food Microbiol. – 2003. –Vol. 82, No. 1. – P. 1–11.

14. *European* Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. http://217.70.33.99/eucast2/ (28 February 2007, date last accessed).

15. *Goldstein E.J.C., Tyrrell K.L., Citron D.M. Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities.//Clin Infect Dis. – 2015. – Vol. 60. – P. 98–107.

16. *Gueimonde M., Sonchez B., de Los Reyes-Gavilon C., Margolles A.* Antibiotic resistance in probiotic bacteria.// Front Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – Article number: 202.

17. *Guo H., Pan L., Li L., Lu J., Kwok L., Menghe B., Zhang H., Zhang W.* Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. //J Food Sci. – 2017. – Vol. 82. – P. 724–730.

18. *Huerta B., Marti E., Gros M., López P., Pompêo M., Armengol J.,* et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. //*Sci. Total Environ.* – 2013. – Vol. 456–457. – P. 161–170.

19. *Knapp C. W., Callan A. C., Aitken B., Shearn R., Koenders A., Hinwood A.* Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. //*Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – Vol. 24. – P. 2484–2494.

20. Lavanya B., Sowmiya S., Balaji S., Muthuvelan B. Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. //Br J Dairy Sci. – 2011. – Vol. 2. – P. 5–10.

21. *Levy S. B., Marshall B.* Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.// *Nat. Med. Suppl.* – 2004. – Vol. 10. – P. 122–129.

22. *Liu C., Zhang Z.Y., Dong K., Yuan J.P., Guo X.K.* Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. // Biomed Environ Sci. –2009. – Vol. 22. – P. 401–412.

23. *Pan L., Hu X., Wang X.* Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. //Food Control. – 2011. –Vol. 22. – P. 1316–1321.

24. *Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K.H.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado.// *Environ. Sci. Technol.*– 2006. – Vol. 40. – P. 7445–7450.

25. *Puphan K., Sornplang P., Uriyapongson S., Navanukraw C.* Screening of lactic acid bacteria as potential probiotics in beef cattle. // Pakistan Journal of Nutrition. – 2015.– Vol. 14, No. 8. – P. 474–479.

26. *Rosander A., Connolly E., Roos S.* Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. //Appl Environ Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 6032–6040.

27. Sornplang P., Leelavatch V., Sukon P., Yowarach S. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from a fermented fish product, plachom. //Res J Microbiol. – 2011. – Vol. 6. – P. 898–903.

28. *Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y., Zhu X.,* et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. //*Sci. Total Environ.* – 2018. – Vol. 621. – P. 1176–1184.

**References**

1. Ostapchuk AM. Molecular-biologycal charachteristics and identification of Bacillus sp. ONU14 strain with entomopathogenic activity // Microbiology&Biotechnology. 2015; Vol. 1:6–13

http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2015_1_4

2. Hoult J, Krieg N, Snit P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Ed: Mir, 1997. – 800 p.

3. Abriouel H, Casado Muñoz MDC, Lavilla Lerma L, Pérez Montoro B, et al. New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods. Food Res Int. 2015; 78: 465–481. DOI:10.1016/j.foodres.2015.09.016

4. Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environ Microbiol. 2001; 3:1–9. DOI:10.1046/j.1462-2920.2001.00161.x

5. Amanpreet K Sidhu, Gauri J Metkar, Sweta P Nandurikar, Sucheta N Patil.

An investigation on metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strains isolated from two different drinking water sources. Int.J.Curr.Microbiol. App.Sci.2015; 4( 2): 305 – 313

6. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol. 2006; 14:176–182 DOI:10.1016/j.tim.2006.02.006

7. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature. 2004; 427: 72–74 https://doi.org/10.1038/nature02241

8. Berendock TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. Nat Rev Microbio. 2015;l 13:310–317 DOI:10.1038/nrmicro3439

9. Berg J, Thorsen MK, Holm PE, Jensen J, Nybroe O, Brandt KK. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. Environ Sci Techno. 2010;l 44:8724–8728 DOI:10.1021/es101798r

10. Botina SG, Poluektova EU, Glazova AA, Zakharevich NV, Koroban NV, et al. Antibiotic resistance of potential probiotic bacteria of the genus Lactobacillus from human gastrointestinal microbiome. Microbiology. –2011; 80: 175–183. DOI:https://doi.org/10.1134/S0026261711020032

11. Campedelli I, Mathur H, Salvett E. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in Lactobacillus spp. Applied and Environmental Microbiology. 2019;85(1): e01738-18 DOI:10.1128/AEM.01738-18

12. Casado Munos MC, Benomar N, Lerma LL, Gálvez A, et al. Antibiotic resistance of Lactobacillus pentosus and Leuconostoc pseudomesenteroides isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. Int J Food Microbiol. 2014; 172: 110–118. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.025

13. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol 2003; 82(1): 1—11. DOI:10.1016/s0168-1605(02)00254-4

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. http://217.70.33.99/eucast2/ (28 February 2007, date last accessed).

15. Goldstein EJC., Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. 2015; 60: 98 – 107. DOI: 10.1093/cid/civ072

16. Gueimonde M, Sonchez B, de Los Reyes-Gavilon C, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Front Microbiol. 2013; 4: Article number: 202. DOI:10.3389/fmicb.2013.00202

17. Guo XC, Liu S, Wang Z, Zhang XX, Li M, Wu B. Metagenomic profiles and antibiotic resistance genes in gut microbiota of mice exposed to arsenic and iron.Chemosphere .2014; 112: 1–8. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.03.068

18. Huerta B, Marti E, Gros M, López P, Pompêo M, Armengol J, et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. Sci. Total Environ. 2013; 456-457: 161–170. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.071

19. Knapp CW, A. Callan C, Aitken B, Shearn R. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. Environ Sci Pollut Res.2017; 24:2484–2494 DOI 10.1007/s11356-016-7997-y

20. Lavanya B, Sowmiya S, Balaji S, Muthuvelan B. Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. Br J Dairy Sci. 2011; 2: 5–10. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.02.011

21. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med. Suppl. 2004; 10: 122–129.DOI: 10.1038/nm1145

22. Liu C, Zhang ZY, Dong K, Yuan JP, Guo XK. 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. Biomed Environ Sci 22:401–412. doi:10.1016/S0895-3988(10)60018-9

23. Pan L, Hu X, Wang X. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. Food Control. 2011; 22: 1316–1321. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.02.006.

24. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. Environ. Sci. Technol. 2006; 40: 7445–7450. DOI: 10.1021/es0604131

25. Puphan K, Sornplang P, Uriyapongson S, Navanukraw C. Screening of lactic acid bacteria as potential probiotics in beef cattle. Pakistan Journal of Nutrition. 2015; 14(8): 474-479. DOI: 10.3923/pjn.2015.474.479

26. Rosander A, Connolly E, Roos S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from Lactobacillus reuteri ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, L. reuteri DSM 17938. Appl Environ Microbiol. 2008; 74: 6032–6040. DOI:10.1128/AEM.00991-08

27. Sornplang P, Leelavatch V, Sukon P, Yowarach S. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from a fermented fish product, plachom. Res J Microbiol. 2011; 6:898–903. DOI:10.3923/jm.2011.898.903.

28. Tan L, Li L, Ashbolt N, Wang X, Cui Y, Zhu X, et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. Sci. Total Environ. 2018; 621:1176–1184. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.110

Стаття надійшла до редакції 10.12.2019 р.