

Wpływ antybiotyków na zmienność właściwości biochemicznych salmonelli

JERZY RZEDZICKI, MAŁGORZATA BOŚ, AGNIESZKA KOLASA, MONIKA SKOWRON

Zakład Chorób Ptaków Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Rzedzicki J., Boś M., Kolasa A., Skowron M.

Influence of antibiotics on *Salmonella* biochemical property variability

Summary

As a result of antibiotic influence the variability of bacterial properties, which are important from an epidemiological point of view, seems to be very real under normal conditions. To a high degree it results from the high intensity of antibiotic and chemiotherapeutic applications. In the case of *Salmonella* rods, inter-action is quite high with the exposure to these substances. Fifty strains from the *Salmonella* genus were used in the tests. They represented three serological types: *Salmonella enteritidis* (36 strains), *Salmonella dublin* (7 strains) and *Salmonella typhimurium* (7 strains). The ability to ferment sugars on peptone and Bitter's mediums as well as the ability to produce aldehyde on Stern's medium was evaluated. Tests revealed changes of some biochemical properties among the studied strains from three different serological types due to passaging on mediums with the addition of small quantities of antibiotics. Variability of biochemical activity of *Salmonella* rods may be caused by the drug-resistance of these microorganisms due to passages from antibiotic presence.

Keywords: *Salmonella*, antibiotics, poultry

Różnice w zakresie właściwości biochemicznych umożliwiają podział salmonelli w obrębie serowaru na biotypy. Aktywność biochemiczna jest wykorzystywana w różnicowaniu szczepów wielu serowarów *Salmonella*, m.in. *S. livingstone*, *S. montevideo*, *S. gallinarum-pullorum*, ale najczęściej stosuje się ją w typowaniu *S. typhimurium* (2, 4, 7, 8, 13, 14). Opracowany przez Duguid i wsp. (5) system typowania *S. typhimurium* pozwala na wyróżnienie wewnątrz tego serowaru 32 typów i ponad 140 podtypów biochemicznych. Typowanie w oparciu o aktywność biochemiczną umożliwia niekiedy zróżnicowanie szczepów reprezentujących nawet ten sam typ bakteriofagowy (1, 9, 10).

Nabywanie oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki jest związane z uruchamianiem przez bakterie różnorodnych mechanizmów biochemicznych (12). Mogą to być zmiany w przepuszczalności powierzchni komórki, modyfikacje miejsc docelowego działania antybiotyków, wytwarzanie alternatywnych dróg przemian metabolicznych czy też synteza enzymów degradujących lub modyfikujących antybiotyki (6). Efektem takich zaburzeń, obok wywoływania oporności, są również zmiany innych właściwości bakte-

rii. Są to zazwyczaj zmiany niespecyficzne, często wspólne dla różnych antybiotyków.

Wynikiem oddziaływania małych stężeń antybiotyków może być zmienność aktywności biochemicznej bakterii. Zmiany aktywności biochemicznej u pałeczek *Salmonella* inkubowanych w obecności wybranych stężeń antybiotyków aminoglikozydowych zaobserwowała Różańska i wsp. (11). Zmiany te polegały na zaburzeniach zdolności *S. enteritidis* i *S. typhimurium* do fermentacji cukrów. Były one istotniejsze w obecności neomycyny i dotyczyły rozkładu glukozy, sorbitolu i ramnozy, natomiast mniejsze, dotyczące wykorzystania glukozy – w obecności streptomycyny. Intensywność zmian biochemicznych była tym wyraźniejsza, im większe były stężenia antybiotyków. Autorzy wykazali, że wyższe poziomy antybiotyków prowadziły do zmian „kodów biochemicznych” w komercyjnych zestawach diagnostycznych, co uniemożliwiało poprawną identyfikację bakterii.

Zagadnienie dotyczące wpływu antybiotyków na właściwości pałeczek *Salmonella* nie jest do końca wyjaśnione. Taki stan badań stanowił inspirację do bardziej kompleksowych badań, których celem było

określenie wpływu działania antybiotyków na zmienność właściwości biochemicznych salmonelli.

Materiał i metody

Do wywołania lekooporności zastosowano antybiotyki z grupy: beta-laktamów (amoksycylina), aminoglikozydów (neomycyna) i peptydów (kolistyna), a także chemioterapeutyki z grupy fluorochinolonów (flumechina i enrofloksacyna).

Analizie poddano właściwości biochemiczne pałeczek *Salmonella* w trzech etapach: w pierwszym – u wszystkich szczepów określono wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki oraz ich właściwości biochemiczne, w drugim – wszystkie szczepy *Salmonella* poddano 10 pasażom na podłożach zawierających dodatki wybranych stężeń: amoksycyliny, neomycyny, kolistyny, flumechiny i enrofloksacyny, w trzecim – określono właściwości salmonelli poddanych pasażom na podłożach z antybiotykami w porównaniu z właściwościami szczepów wyjściowych.

W badaniach wykorzystano 50 szczepów z rodzaju *Salmonella*, które reprezentowały trzy typy serologiczne: *S. enteritidis* (36 szczepów), *S. dublin* (7 szczepów) i *S. typhimurium* (7 szczepów).

Charakterystykę cech biochemicznych wykonano w oparciu o schemat opracowany przez Duguid i wsp. (5). W badaniach określono zdolność do fermentacji cukrów na podłożu peptonowym i na podłożu Bittera. Do badań użyto następujących cukrów: D-(+)-glukozy, L-ramnozy, D (+) ksylozy, D (+) trehalozy i meso-inozytolu. Producentem cukrów była firma Sigma. Fermentację meso-inozytolu badano po 48 godz. inkubacji w temp. 25°C. W przypadku szczepów, które dawały wyniki wątpliwe (brak wyraźnego zażółcenia podłoża), zdolność do fermentacji danego cukru na podłożu Bittera była ostatecznie oceniana w oparciu o intensywność fermentacji tego cukru w wodzie peptonowej. Szczepy dające wyniki wątpliwe były uznawane za zdolne do fermentacji danego cukru na podłożu Bittera, jeżeli rozkładały ten cukier w wodzie peptonowej w ciągu pierwszych 10 godzin inkubacji. Szczepy dające wyniki wątpliwe były uznawane za niezdolne do fermentacji danego cukru na podłożu Bittera, jeżeli rozkładały ten cukier w wodzie peptonowej dopiero po upływie 10 godzin inkubacji.

Tab. 1. Liczba szczepów *S. enteritidis* (n = 36) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza		L-ramnoza		D (+) trehaloza		D (+) ksyloza		meso-inozytol
	czas inkubacji (godz.)								
	10	24	10	24	10	24	10	24	
Przed pasażami	35	36	35	35	33	33	35	36	0
Po pasażach z amoksycyliną	32	36	34	35	32	33	28	35	0
Po pasażach z neomycyną	30	36	30	35	28	30	28	34	0
Po pasażach z kolistyną	35	36	35	35	33	33	33	35	0
Po pasażach z flumechiną	35	36	35	35	30	32	30	36	0
Po pasażach z enrofloksacyną	34	36	32	35	30	32	30	36	0

Tab. 2. Liczba szczepów *S. enteritidis* (n = 36) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów na podłożu Bittera, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza	L-ramnoza	D (+) trehaloza	D (+) ksyloza
Przed pasażami	36	35	33	34
Po pasażach z amoksycyliną	36	30	24	21
Po pasażach z neomycyną	36	23	8	14
Po pasażach z kolistyną	36	33	11	31
Po pasażach z flumechiną	36	32	22	19
Po pasażach z enrofloksacyną	36	20	17	20

Tab. 3. Liczba szczepów *S. dublin* (n = 7) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza		L-ramnoza		D (+) trehaloza		D (+) ksyloza		meso-inozytol
	czas inkubacji (godz.)								
	10	24	10	24	10	24	10	24	
Przed pasażami	7	7	6	7	5	7	5	7	0
Po pasażach z amoksycyliną	4	7	5	7	5	7	5	6	0
Po pasażach z neomycyną	5	7	5	5	4	5	2	6	0
Po pasażach z kolistyną	7	7	5	7	5	7	5	6	0
Po pasażach z flumechiną	7	7	6	6	5	6	2	7	0
Po pasażach z enrofloksacyną	4	7	4	5	4	7	1	6	0

Badanie zdolności do wytwarzania aldehydu przeprowadzono na podłożu Sterna. Podłoże Sterna przygotowywano wg Duguid i wsp. (5).

Wyniki i omówienie

Po 24 godzinach inkubacji wszystkie szczepy rozkładały D (+) glukozę i D (+) ksylozę. 35 szczepów fermentowało L-ramnozę, a 33 szczepy rozkładały D (+) trehalozę. Żaden z badanych szczepów *S. enteritidis* nie wykazywał zdolności do fermentacji meso-inozytolu (tab. 1). Wszystkie szczepy *S. enteritidis*, wykazujące zdolność do fermentacji D (+) glukozy po 10 lub 24 godzinach inkubacji w wodzie peptonowej, rozkładały ten cukier z wytworzeniem kwasu i gazu.

Z danych zamieszczonych w tab. 1 wynika, że niektóre szczepy *S. enteritidis*, po pasażach na podłożach zawierających wybrane stężenia antybiotyków, utraciły zdolność do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej po 10 lub po 10 i 24 godzinach inkubacji. Tabela 2 przedstawia wyniki obrazujące zdolność szczepów *S. enteritidis* do fermentacji cukrów na podłożu Bittera. W tab. 3 przedstawiono liczbę szczepów *S. dublin* zdolnych do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej. W tab. 4 przedstawiono wyniki obrazujące zdolność szczepów *S. dublin* do fermentacji cukrów na podłożu Bittera. Wyniki obrazujące zdolność szczepów *S. typhimurium* do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej przedstawiono w tab. 5. Dane obrazujące zdolność szczepów *S. enteritidis*, *S. dublin* i *S. typhimurium* do produkcji aldehydu na podłożu Sterna, przed wykonaniem pasaży oraz po pasażach na podłożach z antybiotykami przedstawiono w tab. 7.

Wyniki badań własnych wykazały, że spadek wrażliwości na antybiotyki, wywołany za pomocą pasaży, u niektórych szczepów *S. enteritidis*, *S. dublin* i *S. typhimurium* spowodował zmiany aktywności biochemicznej. Część szczepów po pasażach na podłożach z antybiotykami utraciła zdolność do rozkładu niektórych cukrów. Stwierdzono, że częstość obserwowanych zmian była różna w zależności od rodzaju podłoża użytego do badania zdolności bakterii do fermentacji cukrów. Utratę zdolności do fermentacji cukrów, po pasażach z antybiotykami, wykazywano u większej liczby szczepów na uboższym w pepton podłożu Bittera niż w cukrowej wodzie peptonowej. W największym stopniu dotyczyło to szczepów poddanych działaniu neomycyny. Wszystkie szczepy *S. dublin*, które przed wykonaniem pasaży fermentowały L-ramnozę, D (+) trehalozę i D (+) ksylozę na podłożu Bittera, po pasażach z neomycyną utraciły tę

Tab. 4. Liczba szczepów *S. dublin* (n = 7) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów na podłożu Bittera, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza	L-ramnoza	D (+) trehaloza	D (+) ksyloza
Przed pasażami	5	5	5	5
Po pasażach z amoksylicyną	5	4	5	3
Po pasażach z neomycyną	5	0	0	0
Po pasażach z kolistyną	5	5	2	5
Po pasażach z flumechiną	5	4	3	3
Po pasażach z enrofloksacyną	5	3	4	3

Tab. 5. Liczba szczepów *S. typhimurium* (n = 7) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów w wodzie peptonowej, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza		L-ramnoza		D (+) trehaloza		D (+) ksyloza		meso-inozytol
	czas inkubacji (godz.)								
	10	24	10	24	10	24	10	24	
Przed pasażami	7	7	5	5	4	5	5	7	0
Po pasażach z amoksylicyną	6	7	4	4	4	4	0	6	0
Po pasażach z neomycyną	1	7	4	4	2	3	0	4	0
Po pasażach z kolistyną	7	7	4	5	4	5	0	5	0
Po pasażach z flumechiną	7	7	5	5	4	4	1	5	0
Po pasażach z enrofloksacyną	7	7	5	5	4	4	0	5	0

Tab. 6. Liczba szczepów *S. typhimurium* (n = 7) wykazujących zdolność do fermentacji cukrów na podłożu Bittera, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy	D (+) glukoza	L-ramnoza	D (+) trehaloza	D (+) ksyloza
Przed pasażami	7	5	5	0
Po pasażach z amoksylicyną	7	4	1	0
Po pasażach z neomycyną	7	2	0	0
Po pasażach z kolistyną	7	5	3	0
Po pasażach z flumechiną	7	5	3	0
Po pasażach z enrofloksacyną	7	1	2	0

zdolność (tab. 4). W przypadku szczepów *S. enteritidis*, poddanych pasażom z tym antybiotykiem, utrata zdolności do fermentacji D (+) trehalozy, D (+) ksylozy i L-ramnozy na podłożu Bittera dotyczyła, odpowiednio: 25 (tj. 75,8%), 20 (58,8%) i 12 (34,3%) szcze-

Tab. 7. Liczba szczepów salmonelli wykazujących zdolność do produkcji aldehydu na podłożu Sterna, przed pasażowaniem oraz po 10 pasażach na podłożach z dodatkiem wzrastających stężeń wybranych antybiotyków

Szczepy użyte do badań	Szczepy przed pasażami	Szczepy po pasażach				
		amoksycylina	neomycyna	kolistyna	flumechina	enrofloksacyna
<i>S. enteritidis</i> (n = 36)	36	36	27	36	36	34
<i>S. dublin</i> (n = 7)	7	7	7	7	7	7
<i>S. typhimurium</i> (n = 7)	5	5	5	5	5	5

pów (tab. 2). Po pasażach z neomycyną u *S. typhimurium* zanik zdolności do fermentacji D (+) trehalozy i L-ramnozy na podłożu Bittera wykazały, odpowiednio, 5 (tj. 100%) i 3 (60%) szczepy (tab. 6).

Badanie zdolności salmonelli do fermentacji cukrów na podłożu peptonowym wykazało, że częstość obserwowanych zmian, u szczepów poddanych działaniu antybiotyków, zależała od czasu inkubacji na tym podłożu. Po pasażach z antybiotykami, znacznie większa liczba szczepów przejawiała brak zdolności do rozkładu cukrów na podłożu peptonowym po 10, niż po 24 godzinach inkubacji (tab. 1, 3 i 5).

Najmniejsze zmiany, po pasażach z antybiotykami, stwierdzono w zakresie zdolności salmonelli do rozkładu D (+) glukozy. Wszystkie szczepy, które przed pasażowaniem fermentowały ten cukier w ciągu 24 godzin inkubacji na podłożu peptonowym oraz na podłożu Bittera po pasażach z antybiotykami zachowały tę zdolność. Utratę zdolności do fermentacji D (+) glukozy u niektórych szczepów *S. enteritidis*, *S. dublin* i *S. typhimurium* zaobserwowano tylko w ciągu pierwszych 10 godzin inkubacji na podłożu peptonowym. Zmiany te były efektem pasażowania bakterii na podłożach zawierających dodatek neomycyny, amoksycyliny, a także enrofloksacyny (tab. 1, 3 i 5).

Wyniki badań własnych potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia innych autorów świadczące o tym, że małe stężenia antybiotyków mogą wywoływać osłabienie zdolności bakterii w zakresie fermentacji cukrów. Różańska i wsp. (11) obserwowali zmiany cech biochemicznych u pałeczek *S. enteritidis* i *S. typhimurium* spowodowane hodowlą tych bakterii w obecności niskich poziomów aminoglikozydów. Jak podali autorzy, zmiany te były mniejsze w obecności streptomycyny i dotyczyły wykorzystania glukozy, natomiast istotniejsze, dotyczące rozkładu glukozy, sorbitolu i ramnozy – w obecności neomycyny (11). Chen i wsp. (3) wskazali na osłabienie zdolności do metabolizowania cukrów pod wpływem małych stężeń antybiotyków także u innych bakterii.

Z przeprowadzonych badań biochemicznych wynika, że pasażowanie salmonell na podłożach z dodatkiem wybranych antybiotyków może powodować utratę zdolności tych bakterii do produkcji aldehydu na podłożu Sterna. Takie następstwa zaobserwowano tyl-

ko u *S. enteritidis*, po pasażach z neomycyną u 9 (tj. 25%) szczepów oraz po pasażach z enrofloksacyną u 2 (5,6%) szczepów.

Reasumując należy stwierdzić, że w zakresie zmienności badanych cech pod wpływem pasażowania na podłożach z dodatkiem niewielkich stężeń antybiotyków, obserwowano utratę zdolności do fermentacji cukrów. Najwyraźniej zmiany te były widoczne wśród szczepów należących do trzech

różnych typów serologicznych: *S. enteritidis*, *S. dublin* i *S. typhimurium* na podłożu Bittera poddanych działaniu neomycyny. Utrata zdolności do fermentacji cukrów na podłożu peptonowym u szczepów poddanych działaniu antybiotyków zależała od czasu inkubacji. Znacznie większa liczba szczepów przejawiała brak zdolności do rozkładu cukrów po 10 niż po 24 godzinach inkubacji. Zmienność aktywności biochemicznej pałeczek *Salmonella* może być wywołana wyszkoleniem się lekooporności tych drobnoustrojów w wyniku pasażu w obecności antybiotyków i może utrudniać różnicowanie niektórych serowarów.

Piśmiennictwo

- Barker R. M., Kearney G. M., Nicholson P., Blair A. L., Porter R. C., Crichton P. B.: Types of Salmonella paratyphi B and their phylogenetic significance. J. Med. Microbiol. 1988, 26, 285-293.
- Barker R. M., Old D. C.: The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonella. J. Med. Microbiol. 1989, 29, 81-88.
- Chen L. J., Wang J., Levin R. E.: Effects of benzylpenicillin on glucose utilization, macromolecule synthesis and cell wall proteins of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 1996, 22, 13-15.
- Christensen J. P., Olsen J. E., Hansen H. C., Bisgaard M.: Characterization of Salmonella enterica serovar gallinarum biovars gallinarum and pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. Avian Pathol. 1992, 21, 461-470.
- Duguid J. P., Anderson E. S., Alfredsson G. A., Barker R., Old D. C.: A new biotyping scheme for Salmonella typhimurium and its phylogenetic significance. J. Med. Microbiol. 1975, 8, 149-166.
- Dzierżanowska D.: Mechanizmy bakteryjnej oporności na chemioterapeutyki oraz znaczenie kliniczne tego zjawiska. Med. Dypł. 1995, 4, (wyd. specjalne – wrzesień), 3-21.
- Odongo M. O., McLaren I. M., Smith J. E., Wray C.: A biotyping scheme for Salmonella livingstone. Br. Vet. J. 1990, 146, 75-79.
- Old D. C., Munro D. S., Reilly W. J., Sharp J. C. M.: Biotype discrimination of Salmonella Montevideo. Lett. Appl. Microbiol. 1985, 1, 67-69.
- Old D. C., Barker R. M.: Persistent and transient clones of Salmonella typhimurium of phage type 141 recognized by biotyping. Epidem. Inf. 1989 (a), 102, 113-118.
- Old D. C., Barker R. M.: Numerical index of the discriminatory ability of biotyping for strains of Salmonella typhimurium and Salmonella paratyphi B. Epidem. Inf. 1989 (b), 103, 435-443.
- Różańska H., Wojtoń B.: Subinhibycyjne stężenia antybiotyków a wykrywalność pałeczek Salmonella. Medycyna Wet. 1999, 55, 96-100.
- Skowron M., Boś M., Rzedzicki J.: Nabywanie lekooporności przez pałeczki Salmonella w warunkach in vitro. Medycyna Wet. 2003, 59, 696-702.
- Wieliczko A., Kuczkowski M., Chmielewski R., Mazurkiewicz M., Ugorski M.: Właściwości fenotypowe pałeczek Salmonella Gallinarum i Salmonella Pullorum wyizolowanych od kur niosek. Medycyna Wet. 2001, 57, 671-675.
- Zalesiński A., Mazurkiewicz M., Molenda J., Wieliczko A., Molenda O.: Nosicielstwo i siewstwo Salmonella typhimurium u eksperymentalnie zakażonych kur niosek. Medycyna Wet. 1990, 46, 234-238.