

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ВО ВНУТРЕННИХ ВОДОТОКАХ ГОРОДА АСТРАХАНИ

© 2011 Л.В. Ларцева¹, А.А. Истелюева¹, А.В. Менькова²

¹ Астраханский государственный университет

² Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства

Поступила в редакцию 16.05.2011

В статье представлены результаты изучения антибиотикоустойчивости бактерий, выделенных из внутренних водотоков г. Астрахани. Установлено, что микрофлора, выделенная из водоемов в пределах урбанизированных территорий, обладала множественной антибиотикорезистентностью. Выявлена сезонная динамика устойчивости всех штаммов бактерий к испытываемым антибиотикам.

Ключевые слова: гидроэкосистема, городские водотоки, микрофлора, антибиотики, устойчивость, сезонная динамика

Антибиотикорезистентность как неизбежное биологическое явление не является постоянной и снижается со временем. Так, многолетнее наблюдение (1970-2006 гг.) за антибиотикорезистентностью *E. coli* показало, что она выше в Южной Америке, Испании и Турции по сравнению с Центральной Америкой и Европой, что обусловлено климатическими особенностями и плотностью населения [9]. В настоящее время в животноводстве и птицеводстве антибиотики применяют повсеместно не только для лечения и профилактики заболеваний, но и для стимуляции роста и откорма. Ветеринары считают, что без антибиотиков невозможно было бы создать современную технологию содержания животных, повысить их продуктивность и снизить заболеваемость. Однако систематическое загрязнение животноводческой продукции антибиотиками химического и белкового происхождения приводит к возникновению в окружающей среде резистентных форм микроорганизмов, их персистенции и появлению возбудителей, устойчивых к химиопрепаратам [1]. Вызывает особое беспокойство потенциальный перенос антибиотикоустойчивых кишечных патогенов от животных, используемых в пищу человеком, что свидетельствует о необходимости мониторинга за увеличением резистентности к лечебным препаратам [8]. Вследствие широкого использования антибиотиков стали мощным фактором, определяющим микробиологические изменения в популяциях бактерий, проявляющиеся в формировании резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [6]. Поэтому проблема устойчивости микробов к различным лекарствам

стала важной проблемой здоровья в обществе людей. Процесс распространения резистентности бактерий является масштабным и нарастающим, что связано с географическими условиями и быстрой эволюцией во времени [1, 2, 10].

Водоемы в пределах урбанизированных территорий в настоящее время испытывают мощное негативное воздействие собственно самой урбанизации. К концу XX в. они стали рассматриваться в качестве коллекторов, принимающих сточные воды и жидкие отходы [7]. Исследуемые нами рукава Прямая и Кривая Болда, р. Кутум пересекают г. Астрахань в разных направлениях и характеризуются малой водностью и проточностью в связи с регуляцией заполняемости. Следует указать, что в районе точки «Стадиона» (рук. Прямая Болда) расположен большой коттеджный поселок, также по руслу находятся мясокомбинат, рыбокомбинат, судоремонтный завод «Первомайский», ГЭС. По руслу Кривая Болда, выше с. Началово, работают очистные сооружения. Последние функционируют и выше района «Стрелка» (р. Кутум). В связи с этим, изучение антибиотикоустойчивости микробных сообществ городских водоемов является одним из ключевых вопросов в геоэкологических проблемах региона.

Материалы и методы. Отбор проб осуществляли посезонно в вышеуказанных водоемах согласно ГОСТ 51592-2000. Всего протестировано 390 грамнегативных штаммов бактерий сем. Enterobacteriaceae, составляющие 24,6% от всех выделенных изолятов микробиоценоза исследуемых нами водотоков. Определение антибиотикорезистентности микроорганизмов проводили в соответствии с общепринятыми методиками [5], интерпретацию результатов проводили согласно международным стандартам NCCLS. Исследована резистентность к 8 антимикробным препаратам (АМП), принадлежащих к различным

Ларцева Любовь Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры экологии и БЖД. E-mail: lartsevaolga@mail.ru

Истелюева Альфия Адиевна, аспирантка

Менькова Анна Витальевна, научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии. E-mail: ava-131@yandex.ru

фармакологическим группам: ампицилин, бензилпеницилин, левомецитин, тетрациклин, тобрамицин, фурадонин, цефазолин и эритромицин. Полирезистентными считали штаммы бактерий устойчивые к 4 и более антибиотикам. Микроорганизмы, имеющие зоны подавления роста на мясо-пептонном агаре (МПА) при контакте с АМП относили к чувствительным, а не имеющие таких зон – к устойчивым штаммам. Особое внимание уделяли диаметру зоны угнетения роста микроорганизма. Статистическую обработку материалов проводили с использованием стандартов параметрического и непараметрического критериев, а также пакета компьютерного программирования Statistica for Windows. Значимые различия при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показали, что в микробиоценозе водотоков г. Астрахани в последние 3 года доминировали представители сем. Enterobacteriaceae (24,6% от всей выделенной микрофлоры). В структуре этого семейства преобладали бактерии pp. Proteus и Citrobacter (15,8 и 44,3%, соответственно), что было статистически достоверно ($P > 0,05$). Индикаторные E. coli и Salmonella sp. представлены единичными изолятами, что свидетельствует о продолжающемся антропогенном прессинге. Такая же тенденция в бактериоценозе всей гидросистемы дельты р. Волги была отмечена и ранее [2-4].

В анализируемом материале все выделенные нами виды энтеробактерий обладали множественной антибиотикорезистентностью. Независимо от сезонов года и мест отбора проб, они проявляли максимальную чувствительность к тобрамицину и тетрациклину; затем – по убывающей – к левомецитину, ампицилину, эритромицину, цефазолину и фурадонину. Минимальная чувствительность у всех бактерий была зарегистрирована к бензилпенициллину (рис. 1.).

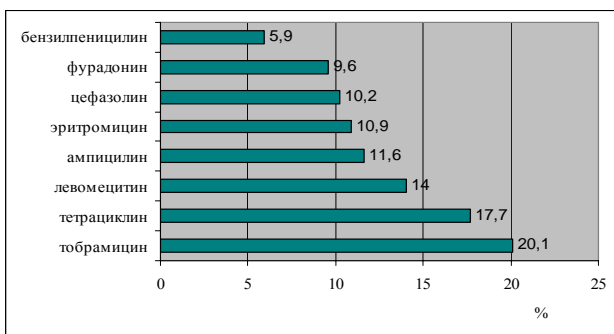


Рис. 1. Антибиотикорезистентность выделенной микрофлоры

Оценка антибиотикорезистентности штаммов бактерий, выделенных из р. Кривая Болда (р-н с. Началово), показала, что наибольшую устойчивость они проявляли к бензилпенициллину, а максимальная чувствительность была отмечена к тобрамицину и тетрациклину. Микрофлора,

изолированная из р. Кутум (р-н Стрелки), обладала наименьшей устойчивостью к левомецитину, тетрациклину и эритромицину. Минимальной чувствительностью обладали монокультуры к бензилпенициллину и цефазолину. Микроорганизмы в пробах р. Прямая Болда (р-н Стадиона) отличались устойчивостью к бензилпенициллину, а наибольшую чувствительность выделенные штаммы проявляли к тобрамицину и цефазолину (рис. 2). Следует указать, что за последнее десятилетие чувствительность к левомецитину уменьшилась в среднем в 4,5 раза, фурадонину – в 3,9 раз, тетрациклину – в 1,6 раз [2, 3].

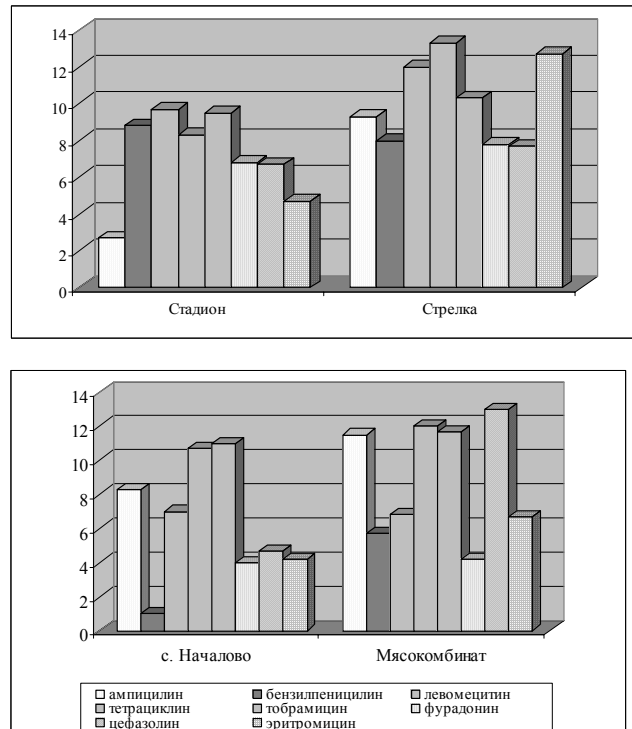


Рис. 2. Уровень антибиотикорезистентности микроорганизмов в исследуемых водотоках

Антибиотикорезистентность исследуемых нами энтеробактерий отличалась выраженной сезонной сукцессией только в р. Кутум, характеризующийся низкой проточностью, мелководностью и заиленностью. Весной все штаммы были менее устойчивы к тобрамицину (28,1%), а наибольшую устойчивость они проявляли к ампицилину, пенициллину и цефазолину – 0%. В летние и осенние периоды устойчивость к испытуемым препаратам была различной и варьировала: от 6,5 до 16,8% и от 1,9 до 17,5%, соответственно.

Анализ полученного материала по зонам угнетения роста бактерий при контакте с антибиотиками на МПА в сезонном аспекте показал, что минимальная чувствительность ко всем испытуемым препаратам была отмечена в начале июня во время паводка во всех исследуемых районах (табл. 1). Весной в апреле в этих же районах уровень антибиотикорезистентности у энтеробактерий был соответственно выше в 4,1; 4,9; 1,4; 1,8 раз, что было статистически

достоверно ($P < 0,05$). По-видимому, это было связано с повышением в паводковых водах штаммов бактерий, устойчивых к АМП, попавшим в гидросистему вследствие мощного многофакторного антропогенного воздействия в этот сезон года. Это могли быть смывы с различных сельскохозяйственных предприятий, в т.ч. животноводческих, а также продукты жизнедеятельности урбоэкосистем. В осенний период в октябре чувствительность к испытуемым антибиотикам одновременно вновь повысилась по сравнению с летними показателями: в р-не с. Началово в 4,4; Стадиона в 5,0; Мясокомбината – в 2,3 и Стрелки – 2,6 раза, что было статистически достоверно ($P < 0,05$).

Обращает на себя внимание абсолютная нечувствительность в паводковый период (начало июня) всех исследуемых штаммов к ампицилину

и бензилпеницилину, а в районах Стадиона, Стрелки и с. Началово – к цефазолину и эритромицину. При этом и весной еще до паводка в районе Стрелки подобная реакция на АМП была отмечена для ампицилина, бензилпеницилина и цефазолина (табл. 1), что свидетельствует о попадании в эти водотоки устойчивых штаммов из очистных сооружений, расположенных выше по руслу р. Волги. В пользу этого могут свидетельствовать данные о почти одинаковой устойчивости исследуемых бактерий к АМП в летний (август) и осенний (октябрь) периоды в районах, расположенных немного ниже очистных сооружений – это точки Стрелки и Началово. Следовательно, на уровень антибиотикорезистентности в исследуемых нами водотоках влияют в основном паводковые воды и близость очистных сооружений.

Таблица 1. Сезонная характеристика антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов

Испытуемые антибиотики	Исследуемые районы															
	р.Кривая Болда (с. Началово)				р. Прямая Болда (р-н Стадиона)				р. Кутум (р-н Стрелки)				р. Прямая Болда (р-н Мясокомбината)			
	Месяцы															
	04	06	08	10	04	06	08	10	04	06	08	10	04	06	08	10
	Зона угнетения роста на МПА, мм															
ампицилин	2,1	0,0	17,1	7,1	6,2	0,0	5,0	0,0	0,0	15,1	13,0	13,3	0,0	10,1	18,1	
бензилпеницилин	6,0	0,0	0,0	0,0	17,0	0,0	2,1	16,1	0,0	0,0	10,2	14,0	0,0	0,0	1,1	16,0
левомецитин	10,2	2,2	7,2	8,2	11,1	2,1	5,2	12,1	8,1	8,2	15,0	13,2	6,1	9,1	1,0	12,4
тетрациклин	16,1	4,1	6,3	16,1	11,0	4,3	1,1	14,2	11,2	3,1	16,1	17,2	19,1	12,2	1,3	20,2
тобрамицин	15,0	7,0	10,1	12,1	9,2	7,0	10,2	10,0	8,0	10,3	12,0	10,0	12,3	9,3	12,1	13,3
фурадонин	7,4	3,1	2,0	5,0	9,1	3,1	4,0	9,1	7,3	0,0	18,3	2,1	10,0	4,4	7,0	3,3
цефазолин	8,2	0,0	10,2	0,0	16,0	0,0	2,1	10,4	0,0	0,0	7,4	16,3	14,4	6,0	15,1	14,0
эритромицин	1,1	0,0	8,1	4,4	0,0	0,0	2,0	10,1	5,1	7,2	14,1	18,0	10,0	7,1	3,0	13,1

Примечание: 0 – чувствительность микроорганизма к антибиотику отсутствует

Следует указать, что при проведении вышеописанных анализов нами было установлено снижение степени чувствительности и полная ее потеря у большинства штаммов по отношению к лекарственным препаратам после 24 часов инкубирования посевов при температуре 37°C, о чем свидетельствовало уменьшение диаметра зоны угнетения роста культур, что, по-видимому, связано с высокой и быстрой адаптивностью испытуемых нами штаммов микроорганизмов (рис. 3, 4).

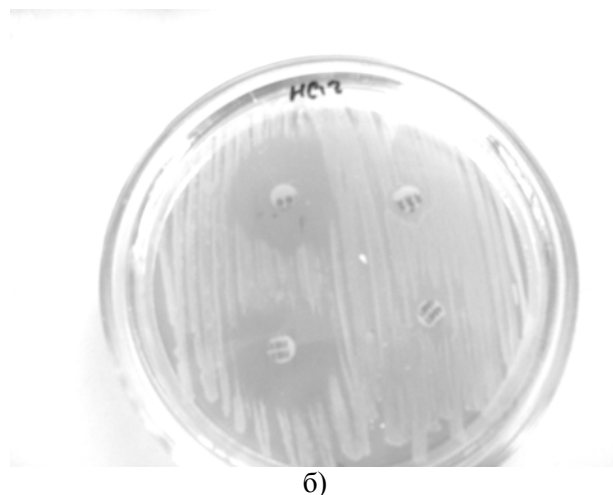
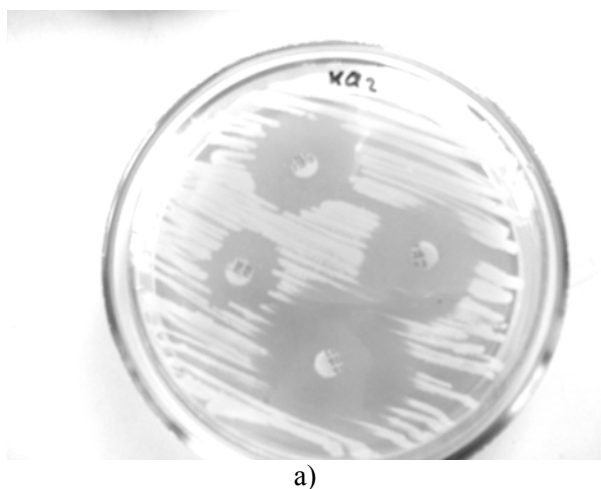


Рис. 3. Изменение диаметра зоны угнетения роста культур: а) четко выраженные зоны угнетения роста; б) снижение зон угнетения роста через 24 часа инкубирования

Выводы: проведенные исследования показали, что энтеробактерии, преимущественно штаммы рр. *Proteus* и *Citrobacter*, входящие в микробный ценоз внутренних водотоков г. Астрахани, имеют более высокий уровень антибиотикорезистентности в районах Стрелки, Стадиона

и с. Началово в паводковый период. Анализируемые микроорганизмы характеризовались наибольшей чувствительностью к тобрамицину, фурадонину, левомецитину и тетрациклину, а в р-не Мясокомбината и к эритромицину. Это свидетельствует об увеличении их поступления в районы исследования и негативном влиянии на бактериоценоз не только городских водоемов, но и, по-видимому, дельтовых участков, куда впадают эти водотоки. Полученные результаты показали необходимость проведения систематического санитарно-микробиологического мониторинга за изменением анитибиотикорезистентности микроорганизмов, циркулирующих в водоемах урбозкосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кальницкая, О.И. Ветеринарно-санитарная оценка продуктов животного происхождения, содержащих антибиотики / О.И. Кальницкая, Б.В. Уша, Э.А. Мишиев // Ветеринария. 2010. № 2. С. 61-63.
2. Лисицкая, И.А. Бактериальные сообщества некоторых компонентов экосистемы дельты Волги и Северного Каспия: автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Астрахань, 2008. 23 с.
3. Обухова, О.В. Бактериоценоз воды и судака (STIZOSTEDION LUCIOPERCA в дельте Волги): автореф. дис. ...канд. биол. наук. – М., 2004. 23 с.
4. Обухова, О.В. Санитарно-микробиологическая оценка гидроэкосистемы дельты Волги / О.В. Обухова, Л.В. Ларцева, И.А. Лисицкая // Гигиена и санитария. 2009. № 1. С. 23-25.
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.
6. Плитов, И.С. Определение чувствительности энтеробактерий к антибиотикам и дезинфицирующим средствам // Ветеринария. 2010. № 12. С. 42-45.
7. Суздаева, А.А. Инженерно-экологическое обустройство и пути повышения: дис. ... канд. техн. наук. – М., 2005. 188 с.
8. Baptista, A. In vitro susceptibility to 11 antimicrobial agents of Escherichia coli isolated from diarrheic and mastitic cattle in Sao Paulo State, Brazil / A. Baptista, J.M. Marin // Ars. Vet., 2005. 22. № 1. P. 31-36.
9. Erb, A. Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal and neethodological variations / A. Erb, T. Stürmer, R. Marre // Eur. J. Clin. Microbiol. and Infec. Diseases. 2007. 26. № 2. P. 83-90.
10. Rossolini, G.M. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy / G.M. Rossolini, E. Mantengoli // Clin. Microbiol. and Infec. 2008. V.14. P. 33-41.

MONITORING OF ENTEROBACTERIA ANTIBIOTIC RESISTANCE ISOLATED IN INTERNAL WATERWAYS OF ASTRAKHAN CITY

© 2011 L.V. Lartseva¹, A.A. Istelyueva¹, A.V. Menkova²

¹ Astrakhan State University

² Caspian Scientific Research Institute of Fish Economy

In article results of studying the bacteria antibiotic resistance allocated from internal water currents of Astrakhan are presented. It is established that microflora allocated from reservoirs within urbanized territories, possessed plural antibiotic resistance. Seasonal dynamics of stability of all bacteria strains stability to examined antibiotics is revealed.

Key words: *hydroecosystem, city waterways, microflora, antibiotics, stability, seasonal dynamics*

Lyubov Lartseva, Doctor of Biology, Professor at the Department of Ecology and Life Safety. E-mail: lartsevaolga@mail.ru
Alfiya Isrelyueva, Post-graduate Student
Anna Menkova, Research Fellow at the Laboratory of Ichthyopathology. E-mail: ava-131@yandex.ru