

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ И УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Н. С. Закревская, А. И. Жумбей

*Белорусский государственный университет, г. Минск;
natali.zakrevskaya.96@gmail.com, lamar96@yandex.ru;
науч. рук. – М. А. Титок, д-р биол. наук, проф.*

В результате полученных результатов установлено, что в почвах Беларуси вне зависимости от источников выделения (животноводческие фермы, железнодорожные магистрали, зоны отдыха) широко распространены бактерии устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и тетрациклину. В почвах, изолированных вблизи животноводческих ферм, с высокой частотой выявляются бактерии резистентные к гентомицину, а также устойчивые одновременно к нескольким антибактериальным препаратам (от 4 до 6). Углеводородоокисляющие бактерии в основном присутствуют в почвенных изолятах из зон отдыха и вблизи автодорожных магистралей. Распространение данных микроорганизмов может быть обусловлено присутствием в их клетках плазмид группы IncP-4 и IncP-9.

Ключевые слова: гены антибиотикорезистентности; гены биodeградации; плазмиды.

Повсеместное использование антибиотиков и углеводов в практической деятельности человека привело к широкому распространению в природной среде обитания антибиотикорезистентных и углеводородоокисляющих бактерий. Особую опасность представляют патогенные микроорганизмы, против которых применение антибактериальных препаратов становится не эффективным. По сути, их распространение рассматривают как новый вид инфекции, угрожающей здоровью человека и животных. В тоже время углеводородоокисляющие бактерии в настоящее время широко используются для создания экологически безопасных технологий очистки окружающей среды от опасных поллютантов.

Одним из способов быстрого распространения генов антибиотикорезистентности и биodeградация среди бактерий является присутствие в их клетках мобильных генетических элементов (плазмид и транспозонов). В этом плане особый интерес представляют R и D-плазмиды широкого круга хозяев группы IncP-1, IncP-4 и IncP-9, способные наследоваться в бактериях разных систематических групп.

Целью настоящей работы являлось изучение распространения антибиотикорезистентных и углеводородоокисляющих бактерий в почвенных образцах, изолированных из различных природных источников на территории Беларуси и наличия в них внехромосомных генетических элементов группы IncP-1, IncP-4 и IncP-9.

Объектом исследования служили почвенные образцы, изолированные на территории Минской и Гомельской областей вблизи животноводческих ферм (д. Дубовляны, д. Канютичи), автодорожных магистралей (д. Олехновичи, г. Минск) и в зонах отдыха (Вилейское вдхр., р. Сож, Гомельские вдхр.). Изолированные из почвы бактерии проверяли на устойчивость к ампициллину (Ap), стрептомицину (Sm), хлорамфениколу (Cm), эритромицину (Ery), гентамицину (Gm), тетрациклину (Tc), канамицину (Km), римфампицину (Rif) и налидиксовой кислоте (Nal), а также на способность использовать в качестве источников углерода гексадекан, мета-, пара-, орто-ксилолы, толуол, бензол, нафталин, фенантрен и пирен.

В ходе исследования применяли микробиологические (культивирование бактерий в присутствии антибиотиков и углеводов), молекулярно-генетические (выделение ДНК из почвы, ПЦР-анализ, клонирование, секвенирование), физические (электрофоретический анализ) и информационные (BLASTN2.2.1 сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) методы исследования.

Анализ почвенных образцов позволил установить, что наибольшее морфологическое разнообразие культивируемых микроорганизмов присутствует в изолятах, отобранных вблизи животноводческих ферм. Вне зависимости от источников выделения большинство бактерий были устойчивы к Ap, Cm и Ery (рис. 1). В тоже время бактерии устойчивые к Gm и Km в основном выявлялись в почвенных изолятах вблизи животноводческих ферм (более 50 и 20 % соответственно), в меньшей степени – в зонах отдыха (3 % и 22 %, соответственно) и не обнаружены в почвенных образцах, взятых вблизи автодорожных магистралей (рис. 1).

Анализ на наличие устойчивости одновременно к нескольким антибиотикам показал, что для бактерий, изолированных из почв вблизи автодорожных магистралей, была характерна устойчивость к 2, 3 и 4 антибиотикам одновременно. Для бактерий, изолированных из почвы в зонах отдыха, в основном была характерна устойчивость одновременно к 3 антибиотикам, а единичные штаммы проявляли устойчивость одновременно к 8 антибиотикам, либо были чувствительны ко всем использованным антибактериальным средствам. Для штаммов, изолированных из почв вблизи животноводческих ферм, была характерна устойчивость одновременно к 4, 5, 6 антибиотикам одновременно. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о широком распространении полирезистентных бактерий в почве, вне зависимости от источника выделения.

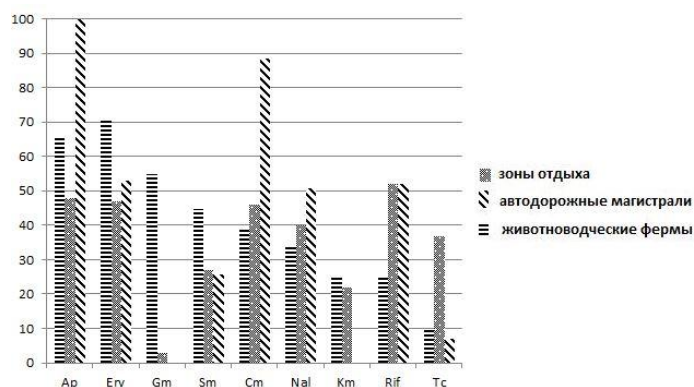


Рис. 1. Количество антибиотикорезистентных бактерий в почвенных образцах

Изолированные бактерии проверяли на способность утилизировать углеводороды. В результате было установлено, что такими свойствами обладают бактерии, выделенные из почвенных изолятов вблизи автодорожных магистралей и зон отдыха (например, около 50 % были способны окислять гексадекан). Кроме того, некоторые из них утилизировали бензол и толуол (рис 2).

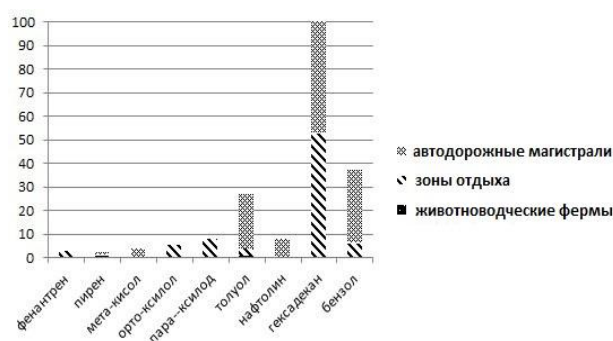


Рис. 2. Количество углеводородоокисляющих бактерий, изолированных из почвенных образцов

Поскольку признаки антибиотикорезистентности и биodeградации могут определяться мобильными генетическими элементами, был осуществлен анализ на присутствие в почве бактерий, содержащих плазмиды группы IncP1, IncP4 и IncP9. Для этого из почвы выделяли тотальную ДНК и использовали ее в качестве матрицы в ПЦР с праймерами, обеспечивающими амплификацию *rep*-областей плазмид данных систематических групп. В результате искомые продукты амплификации, характерные для плазмид групп IncP4 и IncP9, были выявлены при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной соответственно из почвенного изолята вблизи животноводческой фермы (д. Канютичи) и автодорожной магистрали в д. Олехновичи.

Один из продуктов амплификации, соответствующий *rep*-области плазмиды группы IncP-4, был клонирован и секвенирован в составе вектора pUC19.

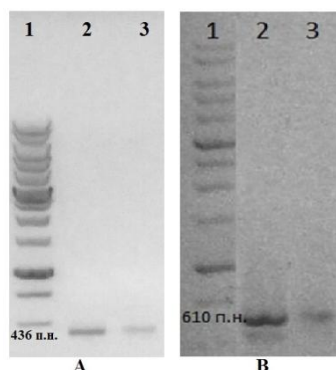


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации *rep*-областей плазмид группы IncP4 (А) и IncP-9 (В)

Номера дорожек соответствуют продуктам амплификации, полученным при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной 2 – из почвенного изолята вблизи животноводческой фермы (А) и автодорожной магистрали (В); 3 – коллекционных бактерий, содержащих плазмиду IncP4 (А) или IncP-9 (В). Дорожка 1 соответствует маркеру ДНК GeneRuller DNA Ladder Mix

Анализ секвенированной последовательности позволил установить ее сходство с плазмидной ДНК, изолированной из бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (в частности, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Enterobacte cloacae*, *Salmonell enterica*, *Proteus mirabilis*), выделенных из природных источников в разных регионах мира (Китай, США, Италия, Бразилия, Япония). Некоторые из выявленных плазмид, помимо генов устойчивости к стрептомицину и сульфониламиду, дополнительно содержали транспозон Tn1721 или Tn3, определяющие соответственно устойчивость к тетрациклину или ампициллину [1, 2].

В результате проведенной работы установлено, что антибиотикорезистентные и углеводородокисляющие бактерии циркулируют в почве на территории Беларуси и их распространение может быть обусловлено за счет плазмид группы IncP-4 и IncP-9 соответственно.

Библиографические ссылки

1. A novel group of IncQ1 plasmids conferring multidrug resistance / M. Oliva [et al.] // Plasmid. 2017. № 86. P. 22–26. DOI: 10.1016/j.plasmid.2016.11.005.
2. Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Recovered from the Environment of a Swine Farrow-to-Finish Operation in the United States / F. Dixie [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017. V.61. № 2. P. 1–9. DOI: 10.1128/AAC.02348-16.