

## Изучение распределения, видового состава и степени устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Enterococcus* в воде озера Байкал

В. В. ПАРФЕНОВА, О. Н. ПАВЛОВА, О. С. КРАВЧЕНКО, Ю. Р. ТУЛУПОВА, Т. Я. КОСТОРНОВА

Лимнологический институт СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
E-mail: parf@lin.irk.ru

### АННОТАЦИЯ

Представлены результаты исследований видового состава, распределения и степени устойчивости к антибиотикам бактерий р. *Enterococcus* в воде оз. Байкал. Показано, что они обитают в литоральных районах озера. В глубоководной части озера исследуемые микроорганизмы не выявлены. Изолировано 120 штаммов, идентифицированных как *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*. В целом штаммы энтерококков, изолированные из воды оз. Байкал, характеризуются как антибиотикочувствительные. Тем ни менее из исследуемой коллекции выделены антибиотикоустойчивые штаммы энтерококков, в том числе и те, для которых характерен промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину.

**Ключевые слова:** бактерии р. *Enterococcus*, антибиотикорезистентность, оз. Байкал.

Одним из направлений исследования состава и функционирования микробных сообществ водных экосистем является изучение микроорганизмов, определяющих или влияющих на качество воды, так как пресные водоемы служат основными источниками питьевой воды. Микробиологическое загрязнение природных вод происходит в большинстве случаев за счет фекальных сточных вод, поэтому еще в XIX в. в качестве индикатора предложены колиформные бактерии. Согласно последним данным, *E. coli* не является показательным видом по многим характеристикам [1, 2]. Поэтому, в соответствии с Директивой Совета Европейского союза 80/778/ЕЕС

о т  
15 июля 1980 г., при оценке качества воды, предназначенной для потребления человеком, в качестве индикаторных микроорганизмов следует определять не только *E. coli*, но и фекальные энтерококки [3]. Энтерококки рекомендуются определять для подтверждения свежего фекального характера загрязнения, так как они обнаруживаются в испражнениях более 90 % здоровых взрослых людей и теплокровных животных [4]. Проблема энтерококковой инфекции заключается не только в том, что спектр возбудителей довольно широк (в большинстве случаев заболевания вызываются *E. faecalis*, *E. faecium*), но и тем, что им присуща природная устойчивость ко многим антибактериальным препаратам [5, 6].

Широко известным примером олиготрофного, глубоководного озера, служащего ис-

Парфенова Валентина Владимировна  
Павлова Ольга Николаевна  
Кравченко Ольга Сергеевна  
Тулупова Юлия Рафиковна  
Косторнова Татьяна Ярославовна

точником питьевой воды, является Байкал. Оз. Байкал условно подразделяется на три части: Южный Байкал – до Селенгинского мелководья, Средний – приольхонская часть до Академического хребта, протянувшегося от п-ова Святой Нос до о-ва Ольхон, и Северный Байкал – самая протяженная, от п-ова Святой Нос до северной оконечности озера в районе пос. Нижнеангарск [7–9]. Общий объем содержащейся в Байкале воды составляет 20 % от всей пресной воды планеты [10]. Именно с этим и связан возрастающий интерес к экологическому потенциалу условно-патогенных бактерий, обнаруживаемых в его воде [11]. Систематические исследования бактерий рода *Enterococcus* в озере начаты с 2005 г. Изучение возможного поступления бактерий рода *Enterococcus* в озеро, распространение, видовой состав, антибиотикорезистентность данных микроорганизмов привлекают внимание как с научной, так и с практической точки зрения. Цель работы – определение видового состава и распределения бактерий р. *Enterococcus* в оз. Байкал с установлением уровня их резистентности к антибактериальным препаратам.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования, направленные на изучение распределения, видового состава бактерий р. *Enterococcus* проведены в 2005–2007 гг. В качестве основных районов исследования выбраны участки локального антропогенного влияния на литоральные районы озера: Южный Байкал – пос. Култук, г. Байкальск, центральная станция разреза пос. Маритуй – пос. Солзан, р. Б. Голоустная; Средний Байкал – дельта р. Селенги, выход основной протоки Харауз, реки Бугульдейка и Сухая, Баргузинский залив; Северный Байкал – устья рек Рель, Тья, Кичера, Верхняя Ангара, Фролиха, Томпуда, города Нижнеангарск, Северобайкальск и Чивыркуйский залив. Отбор проб воды проведен батометром с поверхностного и придонного слоев в стерильные флаконы по общепринятым методикам [12]. На контрольных глубоководных центральных станциях разрезов пос. Листвянка – пос. Танхой, мысов Ухан – Тонкий,

Елохин – Давша пробы воды отбирали от поверхности до дна (рис. 1).

Анализ исследуемых проб на содержание бактерий рода *Enterococcus* проводили методом мембранной фильтрации: объемы воды (50, 100 мл) пропускали через фильтр с размером пор 0,45  $\mu\text{m}$ , затем помещали на селективный агар, содержащий 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид и азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), который подавляет рост грамотрицательных бактерий. Бактерии рода *Enterococcus* на используемой среде образуют либо красные, либо розовые колонии. Посевы инкубировали при 37 °С. Для уточнения результата фильтр с выросшими колониями переносили на среду, содержащую желчь, эскулин и лимонно-аммиачное железо (III). Посевы на данной среде инкубировали при 44 °С в течение 2 ч. Фекальные энтерококки обладают способностью гидролизовать эскулин, входящий в состав среды. При гидролизе эскулина образуется конечный продукт – 6,7-дигидроксикумарин, который при соединении с ионами железа дает черный пигмент, диффундирующий в среду. При определении бактерий рода *Enterococcus* в воде это свидетельствует о положительном результате, который выражали числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 100 мл воды. Внутривидовая идентификация исследуемых бактерий проводилась путем определения их физиолого-биохимических признаков, включенных в определитель бактерий Берджи [13].

Антибиотикорезистентность изучалась у 120 изолированных штаммов дискодиффузионным методом с использованием восьми антибиотиков как широкого спектра действия, так и с выраженной активностью по отношению к энтерококкам: стрептомицина, тетрациклина, ванкомицина, бензилпенициллина, ципрофлоксацина, эритромицина, гентамицина, рифампицина. Анализ материала проведен по трем группам: чувствительные, промежуточные и устойчивые [14].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микробиологические исследования показали, что наибольшая численность бактерий

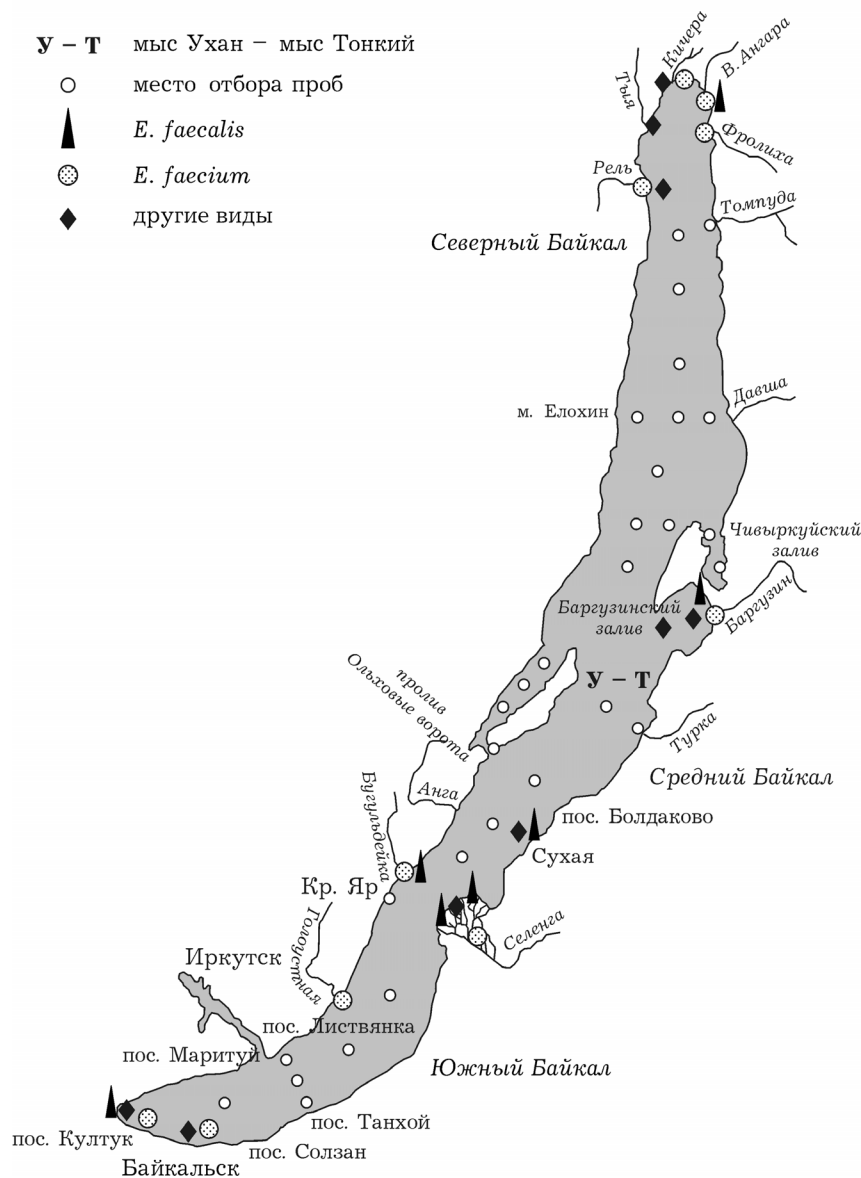


Рис. 1. Карта-схема отбора проб и районы обнаружения бактерий рода *Enterococcus* в воде оз. Байкал

рода *Enterococcus* в Южном Байкале выявлена у пос. Култук, в 1,5 км от берега. Численность бактерий рода *Enterococcus* достигала 225 КОЕ/100 мл. В зоне влияния г. Байкальска исследуемые бактерии обнаружены в основном в поверхностных слоях воды на расстоянии 1, 2 км от места выпуска очищенных сточных вод (15 КОЕ/100 мл).

Значительное количество бактерий р. *Enterococcus*, обнаруженных в этих районах, объясняется тем, что на берегу Байкала, в южной его части, расположены существен-

ные источники антропогенного влияния: пос. Слюдянка (железнодорожный узел), г. Байкальск и пос. Култук [10]. Поселок Култук, расположенный на юго-западном побережье озера, наряду со Слюдянкой и Байкальском входит в состав Слюдянского района. Непосредственный сброс сточных вод в озеро осуществляют ОАО «Байкальский ЦБК» и МУП «Тепловодоснабжение и водоотведение по Слюдянскому району» [15]. Сточные воды БЦБК смешиваются с бытовыми сточными водами, очищаются и поступают в

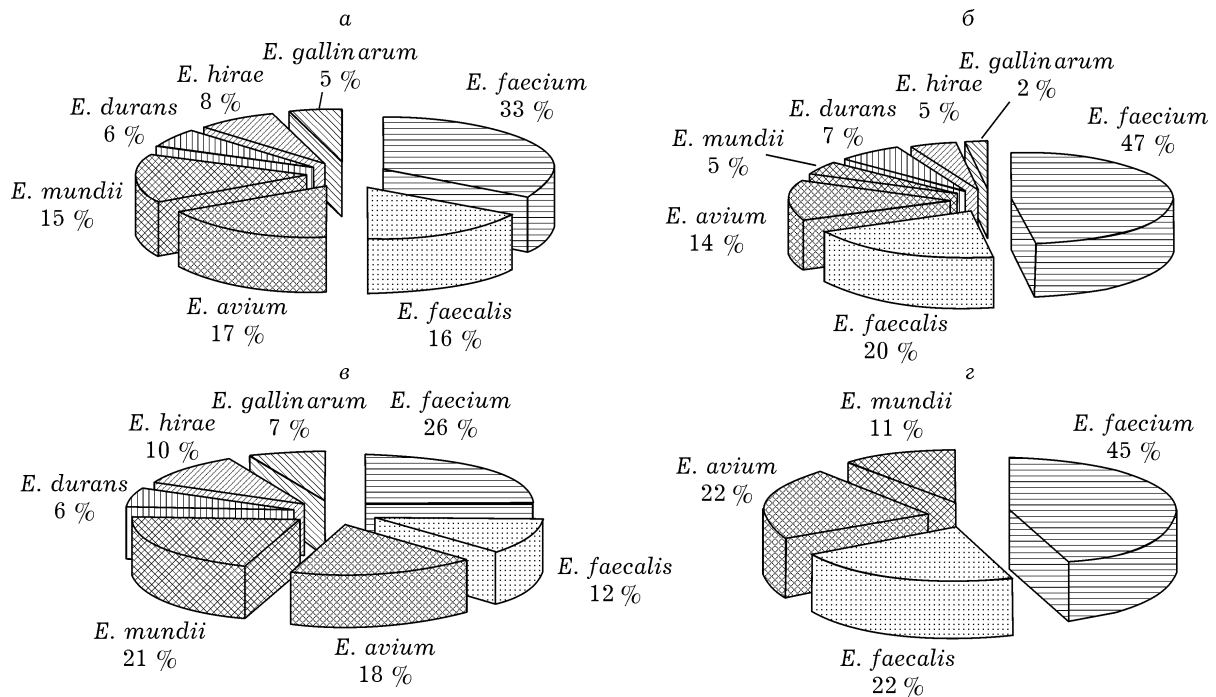


Рис. 2. Соотношение видов бактерий р. *Enterococcus*, изолированных из воды оз. Байкал в целом (а), Южного (б), Среднего (в) и Северного Байкала (г)

пруд-аэратор, а затем непосредственно в оз. Байкал, привнося с собой аллохтонные микроорганизмы.

В Среднем Байкале основное внимание при изучении распределения энтерококков было направлено на исследование влияния р. Селенги, которая при впадении в озеро образует дельту и имеет несколько протоков, выносящих свои воды в Южный и Средний Байкал. Площадь ее водосборного бассейна 447 тыс. км<sup>2</sup>, что составляет 82 % площади бассейна Байкала. В своем нижнем течении р. Селенга разделяется на многочисленные протоки, образуя обширную дельту площадью 1120 км<sup>2</sup>. В среднем за год р. Селенга выносит в оз. Байкал около 29 км<sup>3</sup> воды [16]. Отмечено, что представители рода *Enterococcus* обнаруживаются только в пробах, отобранных непосредственно в протоках Харауз, Левобережная, Колпинная, Средняя, Галутай, в районе поселков Кабанска и Мурзино (от 16 до 50 КОЕ/100 мл). Так, максимальное их количество выявлено в протоке Шаманка – 102 КОЕ/100 мл воды. Согласно литературным данным, именно через южную группу протоков (Левобережная, Шаманка, Харауз) проходит основная часть р. Селенги (около 50 % в период

свободного русла и до 95 % зимой) [16]. Повышенные микробиологические показатели в осенне-летний период в пределах дельты водной растительности и планктона, а увеличение санитарно-бактериологических показателей обусловлено влиянием хозяйственной деятельности, массовым обитанием птиц по берегам, выпасом скота, расположением охотничьих и рыболовных стоянок [17].

В Северном Байкале представители рода *Enterococcus* выявлены в устьях рек Фролиха (77 КОЕ/100 мл) и Баргузин, влияние которых прослеживается на значительном расстоянии по заливу (до 21 КОЕ/100 мл). В других районах численность энтерококков колеблется от 1 до 37 КОЕ/100 мл (влияние верхней Ангары и р. Кичеры).

Отмечено присутствие представителей рода *Enterococcus* в пробах, отобранных непосредственно в протоках рек, таких как Голоустная, Сарма, Рель, Тья, Томпуда, Сухая и Бугульдейка (см. рис. 1). На глубоководных контрольных станциях поселков Листвянка – Танхой, мысов Ухан – Тонкий, Елохин – Давша – бактерии рода *Enterococcus* не выявлены.

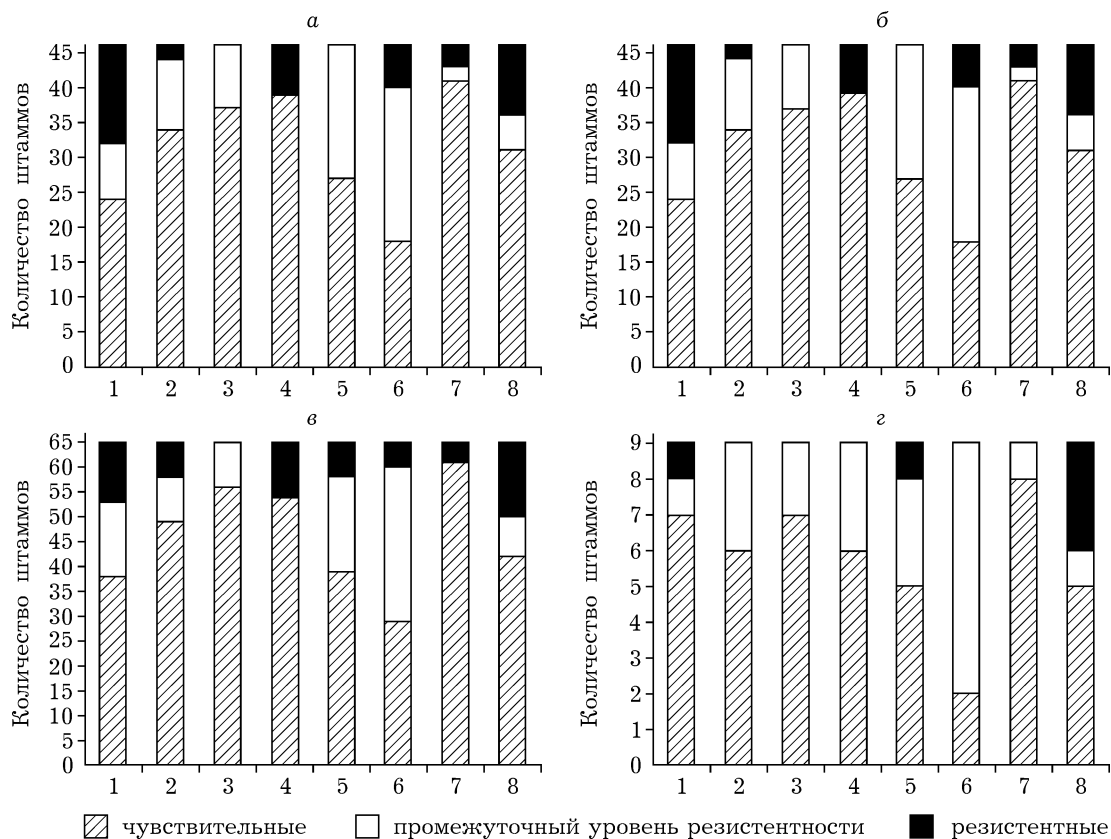


Рис. 3. Суммарная чувствительность к антибиотикам бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из воды оз. Байкал в целом (а), Южного (б), Среднего (в), Северного Байкала (г). 1 – стрептомицин, 2 – тетрациклин, 3 – ванкомицин, 4 – бензилпенициллин, 5 – ципрофлоксацин, 6 – эритромицин, 7 – гентамицин, 8 – рифампицин

За период исследований с 2005 по 2007 г. изолировано 120 штаммов микроорганизмов, отнесенных к роду *Enterococcus*. Из выделенных по всей акватории оз. Байкал штаммов энтерококков 33 % идентифицированы как *E. faecium*, 17 % – *E. avium*, 16 % – *E. faecalis*, 15 % – *E. mundii*, 8 % – *E. hirae*, 6 % – *E. durans*, 5 % – *E. gallinarum* (рис. 2, а). Наибольшим разнообразием видов характеризуются пробы воды, отобранные в Южном и Среднем Байкале. В данных районах выявлено семь видов, в отличие от проб Северного Байкала, где обнаружено четыре (рис. 2, б–г). *E. faecalis*, который наиболее часто встречается у человека и “ответственен” за 80–90 % энтерококковых инфекций, составляет 20 % в пробах, отобранных в Южном и 12 % – в Среднем Байкале. В данных районах доминирует *E. faecium* – 47–26 % соответственно. В последние годы для *E. faecium*, вызывающего 10–15 % энтерококковых ин-

фекций, отмечается повышение частоты зоокомпиального носительства, связанного, по видимому, с большей его резистентностью ко многим антибактериальным препаратам [18–20]. Согласно МУК 4.2.1890–04, следует уделять особое внимание определению чувствительности микроорганизмов, относящихся к таксономическим группам, для которых характерна высокая частота распространения приобретенной резистентности. Поэтому нами проведены эксперименты по выявлению антибиотикорезистентных штаммов, отнесенных к роду *Enterococcus* [14].

Проведенные эксперименты характеризуют данные микроорганизмы как антибиотикочувствительные. Так, высокой чувствительностью характеризовались микроорганизмы по отношению к гентамицину (110 штаммов из 120 – 92 %), бензилпенициллину (99 штаммов – 83 %), ванкомицину (100 штаммов – 83 %). Промежуточным уровнем резистентно-

сти характеризовались микроорганизмы по отношению к эритромицину (60 штаммов – 50 %) и ципрофлоксацину (41 штамм – 34 %). Выделенные культуры обладали наибольшей резистентностью к рифампицину – 23 % и стрептомицину – 22 % (рис. 3). По результатам исследования, *E. faecium* – вид, который наиболее часто встречается среди изолированных штаммов энтерококков, – характеризовался в целом как антибиотикочувствительный. Тем не менее для штаммов этого вида отмечена устойчивость к аминогликозидным антибиотикам (стрептомицин, гентамицин), к бензилпенициллину и рифампицину. Среди штаммов вида *E. faecium*, изолированных из проб воды, отобранных в Южном и Среднем Байкале, отмечается наибольшее количество антибиотикорезистентных штаммов в сравнении с микроорганизмами, изолированными из проб Северного Байкала. Устойчивость данных микроорганизмов отмечена по отношению к семи исследуемым антибиотикам, за исключением ципрофлоксацина (*E. faecium*, изолированные из проб Южного Байкала). Для вида *E. faecalis* отмечена резистентность к стрептомицину (44 %) и бензилпенициллину (22 %). В целом штаммы этого вида, изолированные из оз. Байкал, более антибиотикочувствительные в сравнении с *E. faecium*. Из всей исследуемой популяции выделено 20 штаммов, для которых характерен промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину.

Таким образом, проведенные исследования показали приуроченность бактерий рода *Enterococcus* к литоральным районам оз. Байкал, т. е. к зоне локального антропогенного влияния. Значительные количества исследуемых бактерий в пробах воды, отобранных в Южном и Среднем Байкале, обусловлены влиянием населенных пунктов (пос. Култук, г. Байкальск) и р. Селенги, которая со своими водами несет промышленные и хозяйственно-бытовые стоки городов Улан-Удэ, Селенгинска и других населенных пунктов. В Среднем Байкале качество воды и содержание бактерий р. *Enterococcus* определяется влиянием р. Баргузин – третьей по величине водного стока реки, впадающей в оз. Байкал. Из исследуемых районов изолирова-

ны штаммы: *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*. В основном это виды фекального происхождения и в большинстве случаев могут рассматриваться как специфические индикаторы загрязнения воды фекалиями человека. Изолированные штаммы энтерококков характеризуются как антибиотикочувствительные. Тем не менее из исследуемой коллекции выделены антибиотикоустойчивые штаммы энтерококков, в том числе и те, для которых характерен промежуточный уровень резистентности к ванкомицину. Среди штаммов рода *Enterococcus*, изолированных из проб воды, отобранных в Южном и Среднем Байкале, отмечается наибольшее количество антибиотикорезистентных в сравнении с микроорганизмами, изолированными из проб Северного Байкала.

Появление и распространение устойчивых к ванкомицину клинических штаммов энтерококков (VRE) является одной из проблем здравоохранения. Распространение резистентности к гликопептидам связывают с их длительным лечебным или профилактическим применением в различных клинических ситуациях и с их использованием в ветеринарии [21, 22]. С высокой частотой они встречаются во многих стационарах европейских стран, Австралии и Северной Америки [19, 23–25]. По данным Bates J. с соавторами, в Европе общая резистентность энтерококков к ванкомицину составила 2,2 %, а среди штаммов *E. faecium* – 11,5 % [26]. В России, согласно проведенным исследованиям клинических штаммов, резистентных к ванкомицину и тейкопланину, не обнаружено [6, 25, 27]. Очевидно, это можно объяснить редким применением данных препаратов в России. Но некоторые российские ученые не исключают вероятность заноса штаммов VRE, учитывая тесные торговые связи России с Западной Европой и расширяющийся объем импорта продовольствия [25].

В глубоководной части озера исследуемые микроорганизмы не выявлены. В целом вода оз. Байкал полностью удовлетворяет нормативам, применяемым для оценки пригодности водоемов для питьевого водоснабжения. В литоральных районах озера, где вли-

яние населенных пунктов, притоков и рекреационных зон значительно, увеличивается частота обнаружения бактерий р. *Enterococcus*, а также их антибиотикорезистентных штаммов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гос. контракта № 02.512.11.2168 в рамках ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.”; грантом Министерства образования науки и технологии (Германия) № 02WT0488.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Meier H., Koob C., Ludwig W., Amann R., Frahm E., Hoffmann S., Obst U., Shleifer K. Detection of Enterococci with rRNA targeted DNA probes and their use for hygienic drinking water control // *Water Science and Technology*. 1997. Vol. 35, N 11. P. 437–444.
2. Carrillo M., Estrada E., Hazen T. C. Survival and enumeration of faecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed // *Applied Microbiology*. 1985, N 50. P. 468–476.
3. Фомин Г. С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. М.: Протектор, 2002. С. 70–77.
4. Facklam R. R., Sahw D. F., Teixeira L. M. *Enterococcus* // *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. / eds. Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H. Washington: ASM Press, 1999. P. 297–306.
5. Montecalvo M. A., Horowitz H., Gedris C. Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994. Vol. 38, N 6. P. 1363–1367.
6. Мироненко Л. Г., Перепятко Е. Г. Ванкомицинрезистентные энтерококки // *Annals of Mechnikov Institute*. 2007. N 2. С. 6–10.
7. Верещагин Г. Ю. Происхождение и история Байкала, его фауны и флоры // *Тр. Байкал. лимнол. ст. АН ССР*. 1940. Т. 10. С. 73–239.
8. Кожов М. М. Биология озера Байкал. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 315 с.
9. Намсараев Б. Б., Земская Т. И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. 160 с.
10. Грачев М. А. О современном состоянии экологической системы озера Байкал. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. 156 с.
11. Drucker V. V., Panasyuk E. Yu. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal // *Hydrobiologia*, Springer Netherlands. 2006. Vol. 568, N 1. P. 267–271.
12. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. М.: Наука, 1974. 194 с.
13. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. М.: Мир, 1997. 432 с.
14. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 24 с.
15. Государственный доклад “О состоянии озера Байкал и мерах по его охране в 2006 году”. Иркутск: Сиб. филиал ФГУНПП “Росгеолфонд”, 2007. 420 с.
16. Томберг И. В., Сороковикова Л. М., Синюкович В. Н., Погодаева Т. В. Сток ионов в дельте р. Селенги в условиях малой водности // *Метеорология и гидрология*. 2006. № 12. С. 87–95.
17. Сороковикова Л. М., Тулоханов А. К., Синюкович В. Н., Поповская Г. И., Никулина И. Г., Томберг И. В., Башенхаева Н. В., Максименко С. Ю., Погодаева Т. В., Ильичева Е. А., Некрасов А. В. Качество вод в дельте реки Селенги // *География и природ. ресурсы*. 2005. № 1. С. 73–80.
18. Gordts B., van Landuyt H., Ieven M., Vandamme P., Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonising the intestinal tracts of hospitalized patients // *J. of Infectious Diseases*. 1995. N 11. P. 2842–2846.
19. Padiglione A. A., Grabsch E. A., Olden D., Hellard M., Sinclair M. I., Fairley C. K., Grayson M. L. Fecal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Australia // *Emerging Infectious Diseases*. 2000. Vol. 6. P. 534–536.
20. Дехнич А. В., Кречикова О. И., Туркова Л. И., Страчунский Л. С. Энтерококковое носительство и антибиотикорезистентность в отделении выхаживания недоношенных новорожденных // *Клиническая микробиология и антимикробная терапия*. 2001. Т. 3, № 1. С. 28–38.
21. Plessis P., Lamy T., Donnio P. Y. Epidemiologic analysis of glycopeptides-resistant *Enterococcus* strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration // *European J. of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1995. Vol. 14. P. 959–963.
22. Aarestrup F. M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms // *Microbial Drug Resistance*. 1995. Vol. 3. P. 255–257.
23. Jordens J. Z., Bates J., Griffiths D. T. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* // *J. of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994. Vol. 34. P. 515–528.
24. Белобородова Н. В. Инфекции, вызываемые грампозитивными возбудителями, и опыт применения ванкомицина в интенсивной терапии новорожденных // *Педиатрия*. 1997. № 3. С. 69–74.
25. Тюрин В. П., Тихонов Ю. Г. Антибактериальная терапия инфекционного эндокардита // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000. Т. 2, № 2. С. 31–39.

26. Bates J., Jordens Z. J., Griffiths D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man // *J. of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994. Vol. 34. P. 507–516.
27. Сидоренко С. В., Зезван С. П., Грудинина С. А., Кротова Л. А., Стерхова Г. В. Результаты многоцентрового исследования антибиотикочувствительности энтерококков // *Антибиотики и химиотерапия*. 1998. № 9. С. 9–17.

## **Investigation of the Distribution of the Bacteria of *Enterococcus* Genus in the Water of Lake Baikal, their Species Composition and Degree of Stability to Antibiotics**

V. V. PARFENOVA, O. N. PAVLOVA, O. S. KRAVCHENKO,  
Yu. R. TULUPOVA, T. Ya. KOSTORNOVA

*Limnological Institute SB RAS*  
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3  
E-mail: parf@lin.irk.ru

Results of the investigation of the species composition and distribution of the bacteria of *Enterococcus* genus in the water of Lake Baikal are presented, the degree of stability to antibiotics is also described. It is demonstrated that these bacteria live in the littoral regions of the lake. The microorganisms under investigation were not detected in the deep-water part of the lake. The number of isolated strains is 120, they were identified as *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*. In general, the enterococcus strains isolated from the water of Lake Baikal are characterized as sensitive to antibiotics. Nevertheless, enterococcus strains stable to antibiotics were isolated from the collection under investigation, including the strains for which an intermediate level of stability to vancomycin is characteristic.

**Key words:** bacteria of *Enterococcus* genus, resistivity to antibiotics, Lake Baikal.