

УДК 631.463

МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ К ВЕТЕРИНАРНЫМ АНТИБИОТИКАМ В ОБРАЗЦАХ НАВОЗА И ПОМЕТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.В. Данилова, П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Антибиотики используют в животноводстве для лечения и профилактики заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста. Попадая в окружающую среду, антибиотики способствуют распространению резистентных бактерий и генов устойчивости. Проведено исследование девятнадцати видов навоза и помета различных сельскохозяйственных животных с целью обнаружения генов устойчивости к ветеринарным антибиотикам группы тетрациклинов, сульфонамидов и макролидов (эритромицину). Гены устойчивости выявляли с помощью полимеразной цепной реакции, используя праймеры к генам *tet(X)*, *sul1* и *ereA* соответственно. Установлено, что восемнадцать образцов загрязнены генами устойчивости. Четыре образца содержали одновременно три гена устойчивости. Наиболее распространенным являлся ген устойчивости к тетрациклину *tet(X)*.

Ключевые слова: антибиотики, тетрациклины, сульфонамиды, макролиды, эритромицин, антибиотикорезистентность, гены устойчивости, мультирезистентность, навоз, помет

Введение

Антибиотики широко используют в животноводстве для лечения заболеваний и профилактики инфекций [1, 2]. Кроме того, в последнее время их активно применяют в качестве стимуляторов роста [3]. Например, в США для ускорения роста животных используют более 70% ветеринарных антибиотиков от общего употребляемого в отрасли количества [4]. В животноводстве наиболее успешно используют такие группы антибиотиков, как тетрациклины, сульфонамиды и макролиды [5, 6]. Антибиотики слабо адсорбируются в желудочно-кишечном тракте животных, и до 30–90% назначаемого препарата в неизменном виде выделяется из организма с экскрементами [1, 7].

В сельском хозяйстве навоз традиционно применяется как органическое удобрение, поэтому большие количества антибиотиков могут попасть в почвы и другие компоненты окружающей среды. Ежегодно сотни тонн антибактериальных препаратов поступает на пашни [8, 9]. Кроме того, в окружающую среду поступают антибиотикорезистентные бактерии и гены устойчивости, сформировавшиеся в желудочно-кишечном тракте животных [3]. В настоящее время описано несколько механизмов устойчивости к антибиотикам, которые используют бактерии: 1) модификация антибиотика; 2) уменьшение проницаемости

стенки бактерии для антибиотиков и/или выкачивание его из клетки; 3) структурные изменения в молекулах, являющихся мишенями для антибиотиков; 4) продукция бактерией альтернативных мишеней, которые резистентны к ингибирующему действию антибиотика [10]. При попадании в окружающую среду устойчивые к антибиотикам виды могут передавать свою способность другим неблизкородственным видам в ходе процесса горизонтального переноса генов. Этот процесс представляет особую опасность, поскольку приводит к неконтролируемому распространению антибиотикорезистентности среди микроорганизмов естественных экосистем [6, 11, 12]. В отличие от препаратов антибиотиков, гены устойчивости к антибиотикам сохраняются длительное время, тем самым увеличивая риск их распространения в окружающей среде [9]. На сегодняшний день устойчивость к антибиотикам является растущей глобальной проблемой как животноводства, так и общественного здравоохранения [13].

В России антибиотики широко применяются в ветеринарии. Степень загрязненности продуктов питания остаточными количествами антибиотиков контролируется в обязательном порядке, поэтому информация о количестве используемых антибиотиков и их опосредованном влиянии на человека доступна [14]. Однако сведения о степени загрязненности генами устойчивости к антибиотикам компонентов окружающей среды в России представлены слабо.

Цель настоящей работы – оценить степень распространения генов устойчивости к тетрациклинам, сульфонамидам и макролидам (эритромицин) в навозе и помете сельскохозяйственных животных.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали девятнадцать образцов навоза и помета разных сельскохозяйственных животных, отобранных на фермах Республик Марий Эл, Татарстан и Башкортостан (табл. 1). По форме содержания животных были выбраны фермы трех групп: массовое фермерское производство, малая ферма и частное домохозяйство.

Навоз отбирали методом конверта, доставляли в лабораторию и тщательно перемешивали. Образцы хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выделение тотальной ДНК из образцов навоза массой 0.3 г производили с использованием набора Fast DNA Spin Kit For Soil (MP Bio, Германия). Для амплификации фрагментов последовательности генов устойчивости к антибиотикам группы тетрациклинов, сульфонамидов и макролидов (эритромицин) применяли праймеры *tet(X)*, *sulI* и *ereA* соответственно, последовательности которых представлены в табл. 2. Реакционная смесь (25 мкл) включала следующие компоненты: матричная ДНК – 1 мкл, праймеры (10 мкМоль) – по 1 мкл, dNTP (10 мМоль) – 2.5 мкл, TaqBuffer (10 \times) – 2.5 мкл, MgCl₂ (25 мМоль) – 2.5 мкл, Taq polymerase (5 ед/мкл) – 0.5 мкл и ddH₂O – 14 мкл. Амплификацию производили в термоциклере My Cycler (BioRad, Германия) по следующей программе: предварительная денатурация – 3 мин при 95 $^{\circ}\text{C}$; 35 циклов: денатурация – 30 с при 95 $^{\circ}\text{C}$, отжиг – 30 с при 56 $^{\circ}\text{C}$, элонгация – 30 с при 72 $^{\circ}\text{C}$ и финальная элонгация – 5 мин при 72 $^{\circ}\text{C}$. Наличие генов устойчивости проверяли методом электрофореза в буфере TBE (состав: 89 мМ TRIS; 89 мМ борной кислоты; 2 мМ ЭДТА (рН 8,0)) на 3%-м агарозном геле. Результаты электрофореза

Табл. 1

Образцы навоза и помета, отобранные для исследования

№	Отход животноводства	Место отбора образца	Форма содержания
1	Куриный помет	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, птицефабрика «Пестречинская»	Массовое фермерское производство
2	Куриный помет	Республика Марий Эл, Волжский р-н, ГУП Птицефабрика «Волжская»	
3	Коровий навоз	Республика Марий Эл, Волжский р-н, СПК колхоз «Заря»	
4	Кроличий помет	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	Малая ферма
5	Свиной навоз свежий	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
6	Свиной навоз перепревший	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
7	Куриный помет	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
8	Коровий навоз	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
9	Козий помет	Республика Татарстан, Балтасинский р-н, пгт Балтаси	
10	Перепелиный помет	Республика Татарстан, г. Казань	
11	Коровий навоз	Республика Башкортостан, Шаранский р-н, дер. Зириклы	
12	Свиной навоз с опилками	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
13	Козий помет	Республика Татарстан, Лаишевский р-н, дер. Орел	
14	Куриный помет	Республика Марий Эл, Волжский р-н, дер. Часовенная	Частное домохозяйство
15	Куриный помет	Республика Марий Эл, Волжский р-н, дер. Мамасево	
16	Куриный помет	Республика Татарстан, Дрожжановский р-н, с. Старое Шаймурзино	
17	Кроличий помет	Республика Марий Эл, Волжский р-н, дер. Мамасево	
18	Кроличий помет	Республика Татарстан, Арский р-н, г. Арск	
19	Куриный помет	Республика Татарстан, Лениногорский р-н, г. Лениногорск	

Табл. 2

Праймеры к генам устойчивости к тетрациклинам, сульфонидами и макролидам

Ген устойчивости	Праймер	Последовательность 5'-3'	Размер ПЦР-продукта (bp)	Источник
<i>tet(X)</i>	<i>tet(X)</i> -F	F: GAAAGAGACAACGACCGAGAG	468	[15]
	<i>tet(X)</i> -R	R: ACACCCATTGGTAAGGCTAAG		
<i>suI</i>	<i>suI</i> -F	F: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	163	[16]
	<i>suI</i> -R	R: TGAAGTTCGCGCAAGGCTCG		
<i>ereA</i>	<i>ereA</i> -F	F: AACACCCCTGAACCCAAGGGACG	420	[11]
	<i>ereA</i> -R	R: CTTACATCCGGATTCGCTCG		

после окрашивания геля бромистым этидием оценивали в ультрафиолетовом свете с помощью GelDoc (BioRad, Германия). В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркер Ladder 100 bp (Fermentas, Германия).

Результаты и их обсуждение

Согласно литературным данным, отходы животноводства (навоз, помет) часто бывают одновременно загрязнены генами устойчивости сразу к нескольким классам антибиотиков [12].

В настоящей работе оценивалась степень загрязнения навоза и помета генами устойчивости к тетрациклинам, сульфонидами и макролидам (эритромицину). Результаты анализа образцов навоза и помета представлены в табл. 3.

Табл. 3

Результаты исследования образцов навоза и помета на наличие генов устойчивости к тетрациклинам, сульфонидами и макролидам (эритромицину)

№	Название образца	Ген устойчивости		
		<i>tet(X)</i>	<i>sul1</i>	<i>ereA</i>
1	Куриный помет	+	+	+
2	Куриный помет	+		
3	Коровий навоз			+
4	Кроличий помет	+	+	
5	Свиной навоз свежий	+		
6	Свиной навоз перепревший	+		
7	Куриный помет	+		
8	Коровий навоз	+		
9	Козий помет	+	+	
10	Перепелиный помет	+	+	
11	Коровий навоз			
12	Свиной навоз с опилками	+	+	+
13	Козий помет	+		+
14	Куриный помет	+	+	+
15	Куриный помет	+		+
16	Куриный помет	+	+	
17	Кроличий помет	+	+	
18	Кроличий помет	+	+	+
19	Куриный помет	+	+	

Тетрациклины обладают широким спектром антимикробного действия и являются одними из наиболее часто применяемых препаратов на всех уровнях организации животноводства [17]. В связи с этим наблюдается широкое распространение генов резистентности к тетрациклинам среди сельскохозяйственных животных [10]. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что среди исследуемых образцов наиболее часто встречался ген устойчивости *tet(X)*, отвечающий за дезактивацию антибиотиков тетрациклиновой группы. Ген был обнаружен в 17 исследуемых образцах, что составило 89% от общего количества образцов. Данный ген не был обнаружен лишь в двух образцах – № 3 и № 11. Полученные результаты соответствуют данным, представленным в литературе:

так, в работе [9] установлено, что гены устойчивости к препаратам тетрациклиновой группы содержались во всех 57 исследуемых образцах коровьего навоза. В исследовании [18] тетрациклин-устойчивые гены были обнаружены в 97% из 37 исследуемых образцов навоза, отобранных со свинокомплекса.

Сульфонамиды принадлежат к одному из широко распространенных в ветеринарии классов лекарственных препаратов. Кроме использования в лечебных и профилактических целях, их применяют для ускорения роста животных [5]. Было установлено, что ген устойчивости *sulI* к сульфонамидам был выявлен в 10 из 19 образцов. Он оказался менее распространенным (встречаемость 52%) среди исследуемых видов навоза и помета, чем ген устойчивости к тетрациклинам. По опубликованным данным, гены устойчивости *sulI* и *sulII* в больших количествах были обнаружены в навозе свиней, ежедневно получающих 100 мг/кг антибиотика сульфадиазина [5, 19]. В работе [20] ген *sulI* был найден в 100% из исследуемых образцов свиного навоза.

Макролиды в сельском хозяйстве, так же как и тетрациклины и сульфонамиды, используются не только для лечения и профилактики заболеваний скота, но и для стимуляции их роста. Эритромицин является одним из представителей указанного класса антибиотиков и активно используется фермерами [21]. Скрининг исследуемых образцов показал, что ген устойчивости к эритромицину был найден в 7 из 19 образцов навоза и помета. Встречаемость этого гена среди образцов составила 36%, что меньше по сравнению с загрязнением образцов генами устойчивости к тетрациклинам и сульфонамидам. По данным [18], гены устойчивости к макролидам присутствовали в 89% из 37 исследуемых образцов свиного навоза. Исследование [22] показало похожие результаты распространенности генов резистентности к макролидам среди образцов навоза другой фермы по выращиванию свиней (72%). В работе [23] обнаружено наличие генов устойчивости к данным антибиотикам в 100% исследуемых образцов навоза.

При сравнении образцов навоза и помета, сгруппированных по признаку их происхождения, выявлено, что образцы куриного помета оказались наиболее загрязненными: 28% исследованных образцов было загрязнено одним видом гена устойчивости и 72% образцов – двумя или тремя видами генов устойчивости.

Мультирезистентностью характеризовались и некоторые образцы другого происхождения. В целом выявлено 4 образца, загрязненных сразу тремя генами устойчивости: образцы куриного помета № 1 и № 14, образец свиного навоза с опилками № 12, образец кроличьего помета № 18. Только один образец (№ 11 коровий навоз), отобранный в Шаранском районе Республики Башкортостан, не содержал генов устойчивости к исследуемым антибиотикам.

Далее было проверено предположение о связи степени загрязненности образцов навоза и помета генами устойчивости к антибактериальным препаратам с формой содержания сельскохозяйственных животных. Для этого образцы навоза и помета отбирались как на крупных фермерских хозяйствах, так и на малых фермах и в частных домохозяйствах. Согласно полученным данным гены устойчивости к антибиотикам содержались в отходах всех трех категорий хозяйств. Это, вероятно, связано с активным применением антибактериальных препаратов в животноводческой практике на крупных и средних фермах. В частных же домохозяйствах животные могут получать антибиотики в составе комбикормов.

Кроме того, наличие свойств устойчивости к антибиотикам у животных частных домохозяйств может быть обусловлено покупкой молодняка (например, цыплят) на более крупных фермах, на которых животных при рождении в профилактических целях обрабатывают значительными дозами антибиотиков.

Заключение

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что гены устойчивости к тетрациклинам, сульфонамидам и макролидам (эритромицину) являются распространенными в навозе и помете сельскохозяйственных животных. Ген устойчивости *tet(X)*, отвечающий за разрушение антибиотиков тетрациклиновой группы, оказался наиболее распространенным. Мультирезистентность сразу к трем исследуемым антибиотикам (тетрациклины, сульфонамиды и макролиды) была выявлена в четырех образцах. Сильнее всего генами устойчивости загрязнены образцы куриного помета. Отметим, что степень загрязнения антибиотикорезистентными генами не зависит от формы содержания животных. Гены были обнаружены в образцах навоза и помета, отобранных как на фермах массового производства, так и в малых фермах и частных домохозяйствах.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-00443).

Литература

1. *Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.* A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment // *Chemosphere.* – 2006. – V. 65, No 5. – P. 725–759. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
2. *Bouki C., Venieri D., Diamadopoulou E.* Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2013. – V. 91. – P. 1–9. – doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
3. *Tang X., Lou Ch., Wang Sh., Lu Y., Liu M., Hashmi M.Z., Liang X., Li Z., Liao Y., Qin W., Fan F., Xua J., Brookes P.C.* Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China // *Soil Biol. Biochem.* – 2015. – V. 90. – P. 179–187. – doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.027.
4. *Yang Q., Zhang J., Zhu K., Zhang H.* Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil // *J Environ Sci (China).* – 2009. – V. 21, No 7. – P. 954–959. – doi: 10.1016/S1001-0742(08)62367-0.
5. *Schauss K., Focks A., Heuer H., Kotzerke A., Schmitt H., Thiele-Bruhn S., Smalla K., Wilke B.-M., Matthies M., Amelung W., Klasmeyer J., Schloter M.* Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems // *Trends Anal. Chem.* – 2009. – V. 28, No 5. – P. 612–618. – doi: 10.1016/j.trac.2009.02.009.
6. *Aydin S., Ince B., Ince O.* Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater // *Water Res.* – 2015. – V. 83. – P. 337–344. – doi: 10.1016/j.watres.2015.07.007.
7. *Zhang T., Zhang M., Zhang X., Fang H.H.* Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in activated sludge of sewage treatment

- plants // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43, No 10. – P. 3455–3460. – doi: 10.1021/es803309m.
8. *Song L., Li L., Yang S., Lan J., He H., McElmurry S.P., Zhao Y.* Sulfamethoxazole, tetracycline and oxytetracycline and related antibiotic resistance genes in a large-scale landfill, China // *Sci. Total Environ.* – 2016. – V. 551–552, No 266. – P. 9–15. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.007.
 9. *Kyselková M., Kotrbová L., Bhumibhamon G., Chroňáková A., Jirout J., Vrchotová N., Schmitt H., Elhottová D.* Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure // *Soil Biol. Biochem.* – 2015. – V. 81. – P. 259–265. – doi: 10.1016/j.soilbio.2014.11.018.
 10. *Сунотницкий М.В.* Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – P. 4–13.
 11. *Wang F.-H., Qiao M., Chen Z., Su J.-Q., Zhu Y.-G.* Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest // *J. Hazard. Mater.* – 2015. – V. 299. – P. 215–221. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.028.
 12. *Selvam A., Xu D., Zhao Z., Wong J.W.* Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure // *Bioresour. Technol.* – 2012. – V. 126. – P. 383–390. – doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.045.
 13. *Littmann J., Buys A., Cars O.* Antibiotic resistance: An ethical challenge // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2015. – V. 46, No 4. – P. 359–361. – doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.010.
 14. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М., 2002.
 15. *Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers A.A.* Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 5, No 4. – P. 387–399.
 16. *Pei R., Kim S.-Ch., Carlson K.H., Pruden A.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) // *Water Res.* – 2006. – V. 40, No 12. – P. 2427–2435. – doi: 10.1016/j.watres.2006.04.017.
 17. *Sommer M.O.A., Dantas G.* Antibiotics and the resistant microbiome // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – V. 14, No 5. – P. 556–563. – doi: 10.1016/j.mib.2011.07.005.
 18. *Brooks J.P., Adeli A., McLaughlin M.R.* Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems // *Water Res.* – 2014. – V. 57. – P. 96–103. – doi: 10.1016/j.watres.2014.03.017.
 19. *Heuer H., Focks A., Lamshöft M., Smalla K., Matthies M., Spiteller M.* Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40, No 7. – P. 1892–1900. – doi: 10.1016/j.soilbio.2008.03.014.
 20. *Heuer H., Schmitt H., Smalla K.* Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – V. 14, No 3. – P. 236–243. – doi: 10.1016/j.mib.2011.04.009.
 21. *Pyörälä S., Baptiste K.E., Catry B., van Duijkeren E., Greko C., Moreno M.A., Pomba M.C., Rantala M., Ružauskas M., Sanders P., Threlfall E.J., Torren-Edo J., Törneke K.* Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance // *Vet. J.* – 2014. – V. 200, No 2. – P. 230–239. – doi: 10.1016/j.tvjl.2014.02.028.
 22. *Chen J., Yu Zh., Michel F.C. Jr., Wittum T., Morrison M.* Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73, No 14. – P. 4407–4416. – doi: 10.1128/AEM.02799-06.

23. Koike S., Aminov R.I., Yannarell A.C., Gans H.D., Krapac I.G., Chee-Sanford J.C., Mackie R.I. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production // *Microb. Ecol.* – 2010. – V. 59, No 3. – P. 487–498. – doi: 10.1007/s00248-009-9610-0.

Поступила в редакцию
05.10.16

Данилова Наталья Викторовна, аспирант кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: natasha-danilova91@mail.ru

Галицкая Полина Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: gpolina33@yandex.ru

Селивановская Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

ISSN 1815-6169 (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 4, pp. 507–516

**Multiresistance of Bacteria to Veterinary Antibiotics
in Dung and Manure Samples of Farm Animals**

N.V. Danilova *, *P.Y. Galitskaya* **, *S.Y. Selivanovskaya* ***

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: * natasha-danilova91@mail.ru, ** gpolina33@yandex.ru,
*** svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

Received October 5, 2016

Abstract

Antibiotics are used in animal husbandry for treating and preventing diseases and as growth stimulators. Being disposed in the environment with dung and manure, they contribute to the spread of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes. In this study, the level of contamination of cattle manure and poultry dung by genes resistant to tetracyclines, sulfonamides, and macrolides (erythromycin) has been investigated based on 19 samples. The polymerase chain reaction with specific primers for *tet(X)*, *sul1*, and *ereA* genes has been used to reveal the resistance genes. It has been found that 18 samples contained genes encoding for the resistance to antibiotics. Furthermore, four samples have turned out to be simultaneously contaminated by all three genes. It has been revealed that gene *tet(X)* encoding tetracycline resistance is the most abundant one.

Keywords: antibiotics, tetracyclines, sulfonamides, macrolides, erythromycin, antibiotic resistance, resistance genes, multiresistance, manure, dung

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-04-00443).

References

1. Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 2006, vol. 65, no. 5, pp. 725–759. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
2. Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2013, vol. 91, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
3. Tang X., Lou Ch., Wang Sh., Lu Y., Liu M., Hashmi M.Z., Liang X., Li Z., Liao Y., Qin W., Fan F., Xua J., Brookes P.C. Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China. *Soil Biol. Biochem.*, 2015, vol. 90, pp. 179–187. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.027.
4. Yang Q., Zhang J., Zhu K., Zhang H. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *J. Environ. Sci. (China)*, 2009, vol. 21, no. 7, pp. 954–959. doi: 10.1016/S1001-0742(08)62367-0.
5. Schauss K., Focks A., Heuer H., Kotzerke A., Schmitt H., Thiele-Bruhn S., Smalla K., Wilke B.-M., Matthies M., Amelung W., Klasmeyer J., Schloter M. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *Trends Anal. Chem.*, 2009, vol. 28, no. 5, pp. 612–618. doi: 10.1016/j.trac.2009.02.009.
6. Aydin S., Ince B., Ince O. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater. *Water Res.*, 2015, vol. 83, pp. 337–344. doi: 10.1016/j.watres.2015.07.007.
7. Zhang T., Zhang M., Zhang X., Fang H.H. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, vol. 43, no. 10, pp. 3455–3460. doi: 10.1021/es803309m.
8. Song L., Li L., Yang S., Lan J., He H., McElmurry S.P., Zhao Y. Sulfamethoxazole, tetracycline and oxytetracycline and related antibiotic resistance genes in a large-scale landfill, China. *Sci. Total Environ.*, 2016, vol. 551–552, no. 26, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.007.
9. Kyselková M., Kotrbová L., Bhumibhamon G., Chroňáková A., Jirout J., Vrchotová N., Schmitt H., Elhottová D. Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure. *Soil Biol. Biochem.*, 2015, vol. 81, pp. 259–265. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.11.018.
10. Supotnitsky M.V. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance development. *Biopreparaty*, 2011, no. 2, pp. 4–13. (In Russian)
11. Wang F.-H., Qiao M., Chen Z., Su J.-Q., Zhu Y.-G. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *J. Hazard. Mater.*, 2015, vol. 299, pp. 215–221. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.028.
12. Selvam A., Xu D., Zhao Z., Wong J.W. Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure. *Bioresour. Technol.*, 2012, vol. 126, pp. 383–390. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.045.
13. Littmann J., Buyx A., Cars O. Antibiotic resistance: An ethical challenge. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, vol. 46, no. 4, pp. 359–361. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.010.
14. Sanitary Rules and Norms 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and nutritional value of food products. Moscow, 2002. (In Russian)
15. Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers A.A. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1992, vol. 5, no. 4, pp. 387–399.
16. Pei R., Kim S.-Ch., Carlson K.H., Pruden A. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.*, 2006, vol. 40, no. 12, pp. 2427–2435. doi: 10.1016/j.watres.2006.04.017.
17. Sommer M.O.A., Dantas G. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, vol. 14, no. 5, pp. 556–563. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.005.
18. Brooks J.P., Adeli A., McLaughlin M.R. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Res.*, 2014, vol. 57, pp. 96–103. doi: 10.1016/j.watres.2014.03.017.

19. Heuer H., Focks A., Lamshöft M., Smalla K., Matthies M., Spiteller M. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, vol. 40, no. 7, pp. 1892–1900. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.03.014.
20. Heuer H., Schmitt H., Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, vol. 14, no. 3, pp. 236–243. doi: 10.1016/j.mib.2011.04.009.
21. Pyörälä S., Baptiste K.E., Catry B., van Duijkeren E., Greko C., Moreno M.A., Pomba M.C., Rantala M., Ružauskas M., Sanders P., Threlfall E.J., Torren-Edo J., Törneke K. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *Vet. J.*, 2014, vol. 200, no. 2, pp. 230–239. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.02.028.
22. Chen J., Yu Zh., Michel F.C. Jr., Wittum T., Morrison M. Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 14, pp. 4407–4416. doi: 10.1128/AEM.02799-06.
23. Koike S., Aminov R.I., Yannarell A.C., Gans H.D., Krapac I.G., Chee-Sanford J.C., Mackie R.I. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production. *Microb. Ecol.*, 2010, vol. 59, no. 3, pp. 487–498. doi: 10.1007/s00248-009-9610-0.

Для цитирования: Данилова Н.В., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Мультирезистентность бактерий к ветеринарным антибиотикам в образцах навоза и помета сельскохозяйственных животных // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 4. – С. 507–516.

For citation: Danilova N.V., Galitskaya P.Y., Selivanovskaya S.Y. Multiresistance of bacteria to veterinary antibiotics in dung and manure samples of farm animals. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 4, pp. 507–516. (In Russian)