

МИКРОБИОЛОГИЯ / MICROBIOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107>

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ КУЗНЕЧИКОВ

Научная статья

Лыков И.Н.^{1,*}, Битков М.П.²¹ORCID : 0000-0002-5326-0442;^{1,2}Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (linprof47[at]yandex.ru)

Аннотация

Прямокрылые, включая как короткорогих, так и длиннорогих кузнечиков, являются ключевыми травоядными в пастбищных экосистемах по всему миру и являются одной из наиболее важных групп насекомых с экологической и экономической точек зрения. В статье рассматривается устойчивость микроорганизмов кузнечиков к антибиотикам и значение кузнечиков как резервуаров антибиотико-резистентных микроорганизмов. Установлена относительная схожесть микрофлоры исследованных кузнечиков, что, вероятно, связано с местом их обитания и тесным взаимодействием с растительной микрофлорой. У кузнечиков чаще всего встречаются *Proteobacteria spp.*, *Enterobacte spp.*, *Lactococcus spp.* и *Bacillus spp.* Показано, что микроорганизмы исследованных кузнечиков обладают мультирезистентностью к использованным антибиотикам. Наибольшей мультирезистентностью отличаются такие виды, как *Bacillus spp.* и *Enterobacter spp.* Чаще всего исследованные кузнечики обладали устойчивостью к фосфомицину, оксациллину, кларитромицину, линкомицину и тобрамицину. Наши исследования показывают, что кузнечики действуют как резервуары антибиотико-резистентных микроорганизмов, которые они впоследствии распространяют в окружающей среде, реализуя горизонтальный перенос генов.

Ключевые слова: прямокрылые насекомые, кузнечики, микроорганизмы, антибиотики, резистентность.

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE GRASSHOPPER MICROFLORA

Research article

Likov I.N.^{1,*}, Bitkov M.P.²¹ORCID : 0000-0002-5326-0442;^{1,2}K.E. Tsiolkovsky Kaluga State University, Kaluga, Russian Federation

* Corresponding author (linprof47[at]yandex.ru)

Abstract

Grasshoppers, including both short-horned and long-horned grasshoppers, are key herbivores in pasture ecosystems worldwide and are one of the most ecologically and economically important groups of insects. This article examines the antibiotic resistance of grasshopper microorganisms and the importance of grasshoppers as reservoirs of antibiotic-resistant microorganisms. The relative similarity of the microflora of the grasshoppers studied was established, which is probably due to their habitat and close interaction with plant microflora. In grasshoppers, *Proteobacteria spp.*, *Enterobacte spp.*, *Lactococcus spp.* and *Bacillus spp.* are the most common. It was shown that the microorganisms of the studied grasshoppers have multiresistance to the used antibiotics. Such species as *Bacillus spp.* and *Enterobacter spp.* have the greatest multiresistance. Most frequently, the grasshoppers studied were resistant to fosfomycin, oxacillin, clarithromycin, lincomycin, and tobramycin. Our studies show that grasshoppers act as reservoirs of antibiotic-resistant microorganisms, which they subsequently spread in the environment, implementing horizontal gene transfer.

Keywords: orthopneas, grasshoppers, microorganisms, antibiotics, resistance.

Введение

Кузнечики относятся к прямокрылым и являются основными травоядными в глобальной пастбищной экосистеме. Они имеют огромное экологическое и экономическое значение. Травоядные кузнечики используют свои кишечные бактерии для извлечения питательных веществ из неперевариваемых тканей растений [1]. Из-за потребления большого количества растительной биомассы кузнечики являются наиболее важными первичными потребителями и играют важную роль в поддержании экологического баланса [2]. Кузнечики также считаются ключевым индикатором стабильности пастбищных экосистем, особенно в местах обитания, находящихся под угрозой исчезновения, таких как луга [1].

Насекомые связаны с множеством различных микробов, роль которых в формировании взаимодействия насекомых и растений мы только начинаем понимать. Помимо прямой выгоды от симбиотического микробного метаболизма, насекомые получают и передают микробы в окружающей среде, что делает их идеальными переносчиками и потенциальными бенефициарами болезней растений и микробов, которые изменяют защитные свойства растений [3].

Взаимоотношения с микробными симбионтами наблюдаются у многих насекомых. Они имеют решающее значение для их выживания и развития. Эндосимбионты могут оказывать глубокое влияние на экологию и эволюцию насекомых и управлять совместной эволюцией растений и травоядных [4]. Но эндосимбионты могут быть носителями генов устойчивости к антибиотикам. Устойчивость к противомикробным препаратам является глобальной проблемой для здоровья, как животных, так и людей. Микроорганизмы способны реализовывать биохимические механизмы и генетические процессы, которые снижают эффективность антибиотиков [5], [6].

Инфекции, вызванные бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, представляют собой растущую проблему из-за появления и распространения резистентности микробов к лекарственным препаратам и отсутствия разработки новых противомикробных препаратов.

Устойчивость к антибиотикам развивается в результате воздействия антимикробных агентов на популяции и сообщества бактерий. Аналогичный обмен на генетическом уровне происходит между антибиотико-резистентными микроорганизмами, попавшими в окружающую среду, и естественной бактериальной микрофлорой [7], [8], [9].

Бактерии выработали древние механизмы, позволяющие противостоять воздействию молекулы антибиотика. Устойчивость к антибиотикам кодируется несколькими генами, многие из которых могут передаваться между бактериями [10], [11], [12].

Таким образом, насекомые представляют собой возможный путь распространения детерминант устойчивости к антибиотикам в окружающей среде. Поэтому целью и задачами настоящего исследования является изучение микрофлоры кузнечиков и определение ее резистентности к антибиотикам.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили следующие прямокрылые насекомые (n=10):

- Кузнечик серый (*Decticus verrucivorus*).
- Певчий кузнечик (*Tettigonia cantans*).
- Кузнечик Резеля (*Metrioptera Roeselii*).
- Кустолюбка пепельная (*Pholidoptera Griseoptera*).

Насекомых вылавливали в парках, в луговых и лесных массивах. Пойманных насекомых стерильным пинцетом помещали в стерильные пробирки и выдерживали в течение 3 часов. После этого насекомых выпускали.

В лабораторных условиях в каждую пробирку заливали по 5 мл стерильного физиологического раствора. После встряхивания из каждой пробирки переносили стерильной пипеткой по 1 мл физиологического раствора в 2 пустые стерильные чашки Петри, которые заливали питательным агаром, остуженным до 40–45°C. После застывания среды чашки переворачивали вверх дном и термостатировали при температуре 30°C в течение 48 часов. Выделенные из образцов бактерии идентифицировали стандартными микробиологическими методами на основании их морфологических и биохимических характеристик, а также методом масс-спектрометрии на анализаторе MALDI-TOF MS **autoflex speed** (фирма Bruker).

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам осуществляли диффузионным методом с использованием дисков, пропитанных антибиотиками (табл. 1).

Таблица 1 - Перечень использованных антибиотиков

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.1>

№ п/п	Наименование	Концентрация, мкг	Обозначение
1	Оксациллин	10	ОКС
2	Кларитромицин	15	КТМ
3	Бензилпенициллин	10	ПЕН
4	Тобрамицин	30	ТОВ
5	Фуразолидон	5	ФРН
6	Доксициклин	30	ДОК
7	Ломефлоксацин	5	ЛОМ
8	Фосфомицин	200	ФОС
9	Олеандомицин	15	ОЛЕ
10	Неомицин	30	НЕО
11	Тетрациклин	30	ТЕТ
12	Ампициллин	10	АМР
13	Левомецетин	30	ЛЕВ
14	Линкомицин	15	ЛИН

После инкубации были измерены зоны ингибирования роста микроорганизмов (табл. 2).

Таблица 2 - Оценка чувствительности микроорганизмов к антибиотикам по зоне задержки роста

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.2>

Уровни устойчивости к антибиотику	Диаметр зон ингибирования роста, мм
Высокий	> 25
Средний	от 16 до 25

Низкий	<15
--------	-----

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием табличного процессора Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Общими для всех видов кузнечиков были *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* и *Enterococcus spp.* У некоторых кузнечиков были выделены *Actinobacteria spp.*, *Proteobacteria spp.* и *Firmicutes spp.*

Общее количество микроорганизмов, выделенных из кузнечиков, варьировало от 10^4 КОЕ до 10^6 КОЕ. Исследования показали относительную схожесть микрофлоры исследованных насекомых (табл. 3). На это, вероятно, влияет связь микробиоты насекомых с местом обитания и тесным взаимодействием с растительной микрофлорой.

Таблица 3 - Микробный пейзаж кузнечиков

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.3>

Наименование насекомых	Общее количество микроорганизмов, КОЕ	Выделенные микроорганизмы
<i>Decticus verrucivorus</i>	10^6	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Actinobacteria spp.</i> , <i>Proteobacteria spp.</i>
<i>Tettigonia cantans</i>	10^4	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Proteobacteria spp.</i> , <i>Firmicutes spp.</i>
<i>Metrioptera Roeselii</i>	10^5	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Proteobacteria spp.</i> , <i>Firmicutes spp.</i> , <i>Actinobacteria spp.</i>
Pholidoptera Griseoptera	10^4	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Proteobacteria spp.</i>

Соотношение микроорганизмов, входящих в микробиом кузнечиков, отличается более выраженным представительством *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.* (рис. 1).

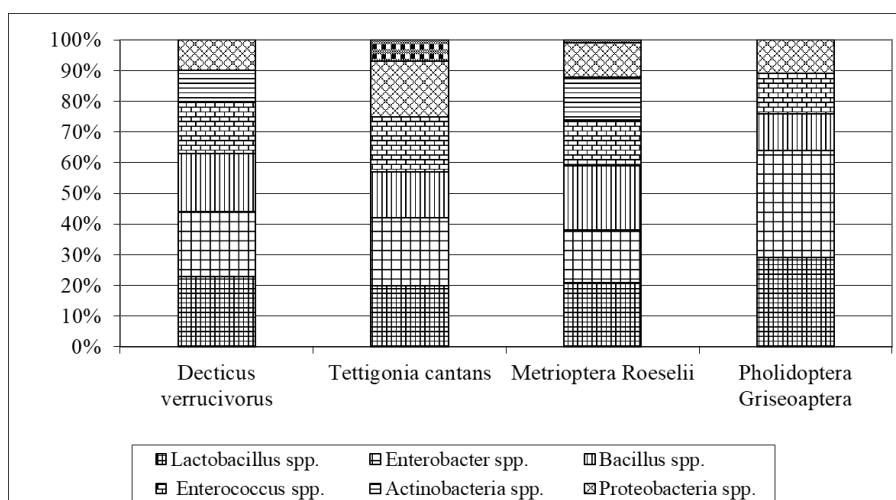


Рисунок 1 - Соотношение представителей микрофлоры, входящей в микробиом кузнечиков

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.4>

Чаще всего исследованные кузнечики обладали устойчивостью к фосфомицину, оксациллину, кларитромицину, линкомицину, ампициллину, бензилпенициллину, олеандомицину и тобрамицину. Уровень резистентности изолятов к антибиотикам варьировал у кузнечиков от 14,3% до 78,6% (рис. 2).

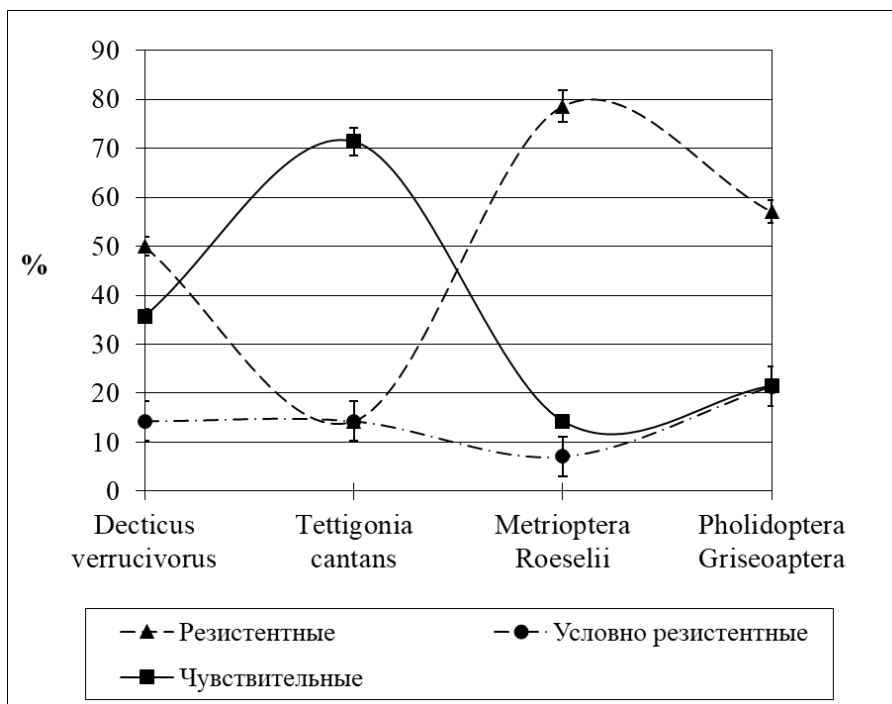


Рисунок 2 - Уровень резистентности кузнечиков к антибиотикам
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.5>

Выделенные микроорганизмы в той или иной степени обладали мультирезистентностью к исследованным антибиотикам. Наибольшей мультирезистентностью отличались такие виды, как *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.*. В то же время *Enterococcus spp.*, *Proteobacteria spp.*, *Firmicutes spp.* и *Actinobacteria spp.* проявляли наибольшую чувствительность к бензилпенициллину, доксициклину, кларитромицину, левомецетину, линкомицину, неомицину, оксациллину и олеандомицину (рис. 3).

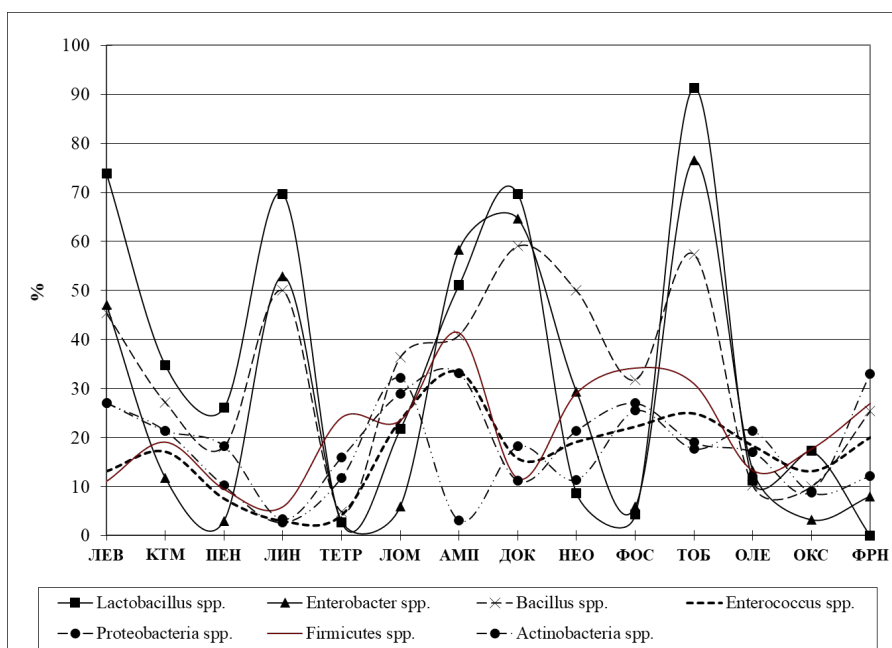


Рисунок 3 - Антибиотикограмма резистентности микрофлоры кузнечиков
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.125.107.6>

Таким образом, наши исследования подтверждают предположение о том, что насекомые могут быть потенциальными распространителями микроорганизмов, резистентных к антибиотикам.

Заключение

1. Общими для всех видов кузнечиков были *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* и *Enterococcus spp.*
2. Общее количество микроорганизмов, выделенных из кузнечиков, варьировало от 10^4 КОЕ до 10^6 КОЕ.
3. Соотношение микроорганизмов, входящих в микробиом кузнечиков, отличается более выраженным представительством *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*
4. Чаще всего исследованные кузнечики обладали устойчивостью к фосфомицину, оксацилину, кларитромицину, линкомицину, ампициллину, бензилпенициллину, олеандомицину и тобрамицину.
5. Уровень резистентности изолятов к антибиотикам варьирует у кузнечиков от 14,3% до 78,6%.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (РАН) за оказанную помощь в идентификации выделенных микроорганизмов методом масс-спектрометрии

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Acknowledgement

The authors would like to express their gratitude to the staff of the G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms (RAS) for their assistance in identifying the isolated microorganisms by mass spectrometry

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Muratore M. The gut bacterial communities across six grasshopper species from a coastal tallgrass prairie / M. Muratore, C. Prather, Y. Sun // PLoS One. – 2020. – Vol. 15(1). – P. e0228406. – DOI: 10.1371/journal.pone.0228406.
2. Sun T. Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) Community Composition in the Rangeland of the Northern Slopes of the Qilian Mountains in Northwestern China / T. Sun, Z.Y. Liu, L.P. Qin et al. // Journal of Insect Science. – 2015. – Vol. 15. – Iss. 1. – P. 6. – DOI: 10.1093/jisesa/ieu171.
3. Coolen S. The secret life of insect-associated microbes and how they shape insect-plant interactions / S. Coolen, R.D. Magda, C.U. Welte // FEMS Microbiol Ecol. – 2022. – Vol. 98(9). – P. fiac083. – DOI: 10.1093/femsec/fiac083.
4. Лыков И.Н. Микроорганизмы: Биология и экология / И.Н. Лыков, Г.А. Шестакова. – Калуга : СерНа, 2014. – 451 с.
5. Dunachie S.J. The challenges of estimating the human global burden of disease of antimicrobial resistant bacteria / S.J. Dunachie, N.P. Day, Ch. Dolecek // Curr. Opin. Microbiol. – 2020. – Vol. 57. – P. 95–101. – DOI: 10.1016/j.mib.2020.09.013.
6. Paniagua V.L.R. Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host / V.L.R. Paniagua, E. Frago, M. Kaltenpoth et al. // Front Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 556. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.00556.
7. Лыков И.Н. Медико-экологические аспекты лекарственной устойчивости бактерий, выделенных от домашних животных и их владельцев / И.Н. Лыков, И.Е. Галемина, Н.С. Зайцева и др. // Проблемы региональной экологии. – 2021. – № 5. – С. 37–41. – DOI: 10.24412/1728-323X-2021-5-37-41
8. Лыков И.Н. Медико-экологические аспекты присутствия в воздухе антибиотико-резистентных микроорганизмов / И.Н. Лыков, Н.Т. Гулдорав, Е.В. Ковалева // Экология урбанизированных территорий. – 2020. – № 4. – С. 20–25. – DOI: 10.24412/1816-1863-2020-4-20-25
9. Russell A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction / A.D. Russell // J. Appl. Microbiol. – 2002. – № 92(1). – P. 1S-3S. – DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.14.x
10. Lykov I.N. Research of antibiotic resistance of microorganisms isolated from fruits and vegetables / I.N. Lykov, M.A. Kakharova, V.S. Kureber et al. // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 839 (2021) 042003 IOP Publishing. – 2021. – DOI: 10.1088/1755-1315/839/4/042003
11. Andam C.P. Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer / C.P. Andam, G.P. Fournier, J.P. Gogarten // FEMS Microbiol. Rev. – 2011. – Vol. 35. – P. 756–767. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00274.x
12. Cenci-Goga B.T. Cross-sectional study to identify risk factors associated with the occurrence of antimicrobial resistance genes in honey bees *Apis mellifera* in Umbria, Central Italy / B.T. Cenci-Goga, P. Sechi, M. Karama et al. // Environ Sci Pollut Res Int. – 2020. – Vol. 27(9). – P. 9637–9645. – DOI: 10.1007/s11356-020-07629-3

Список литературы на английском языке / References in English

1. Muratore M. The gut bacterial communities across six grasshopper species from a coastal tallgrass prairie / M. Muratore, C. Prather, Y. Sun // PLoS One. – 2020. – Vol. 15(1). – P. e0228406. – DOI: 10.1371/journal.pone.0228406.
2. Sun T. Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) Community Composition in the Rangeland of the Northern Slopes of the Qilian Mountains in Northwestern China / T. Sun, Z.Y. Liu, L.P. Qin et al. // Journal of Insect Science. – 2015. – Vol. 15. – Iss. 1. – P. 6. – DOI: 10.1093/jisesa/ieu171.
3. Coolen S. The secret life of insect-associated microbes and how they shape insect-plant interactions / S. Coolen, R.D. Magda, C.U. Welte // FEMS Microbiol Ecol. – 2022. – Vol. 98(9). – P. fiac083. – DOI: 10.1093/femsec/fiac083.

4. Lykov I.N. Mikroorganizmy: Biologija i jekologija [Microorganisms: Biology and Ecology] / I.N. Lykov, G.A. Shestakova. – Kaluga : SerNa, 2014. – 451 p. [in Russian]
5. Dunachie S.J. The challenges of estimating the human global burden of disease of antimicrobial resistant bacteria / S.J.Dunachie, N.Pj. Day, Ch. Dolecek // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2020. – Vol. 57. – P. 95–101. – DOI: 10.1016/j.mib.2020.09.013.
6. Paniagua V.L.R. Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host / V.L.R. Paniagua, E. Frago, M. Kaltenpoth et al. // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 556. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.00556.
7. Lykov I.N. Mediko-jekologicheskie aspekty lekarstvennoj ustojchivosti bakterij, vydelennyh ot domashnih zhivotnyh i ih vladel'cev [Medico-ecological aspects of drug resistance of bacteria isolated from pets and their owners] / I.N. Lykov, I.E. Galemina, N.S. Zajceva et al. // *Problemy regional'noj jekologii* [Problems of regional ecology]. – 2021. – № 5. – P. 37–41. – DOI: 10.24412/1728-323X-2021-5-37-41 [in Russian]
8. Lykov I.N. Mediko-jekologicheskie aspekty prisutstvija v vozduhe antibiotiko-rezistentnyh mikroorganizmov [Medical and Environmental Aspects of the Presence of Antibiotic-Resistant Microorganisms in the Air] / I.N. Lykov, N.T. Guldorava, E.V. Kovaleva // *Jekologija urbanizirovannyh territorij* [Ecology of urbanized areas]. – 2020. – № 4. – P. 20–25. – DOI: 10.24412/1816-1863-2020-4-20-25 [in Russian]
9. Russell A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction / A.D. Russell // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – № 92(1). – P. 1S-3S. – DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.14.x
10. Lykov I.N. Research of antibiotic resistance of microorganisms isolated from fruits and vegetables / I.N. Lykov, M.A. Kakharova, V.S. Kureber et al. // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 839 (2021) 042003 IOP Publishing. – 2021. –DOI:10.1088/1755-1315/839/4/042003
11. Andam C.P. Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer / C.P. Andam, G.P. Fournier, J.P. Gogarten // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2011. – Vol. 35. – P. 756–767. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00274.x
12. Cenci-Goga B.T. Cross-sectional study to identify risk factors associated with the occurrence of antimicrobial resistance genes in honey bees (*Apis mellifera*) in Umbria, Central Italy / B.T. Cenci-Goga, P. Sechi, M. Karama et al. // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2020. – Vol. 27(9). – P. 9637–9645. – DOI: 10.1007/s11356-020-07629-3