

УДК 579.254.22; 579.258;579.63

UDC 579.254.22; 579.258;579.63

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (биологические науки, сельскохозяйственные науки)

4.1.3. Agrochemistry, agro-soil science, plant protection and quarantine (biological sciences, agricultural sciences)

ОЦЕНКА ВЫЖИВАЕМОСТИ И СОХРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КУЛЬТУР *ESCHERICHIA COLI* XL-1, СОДЕРЖАЩИХ ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРА pTURBO GFP-B, pTURBO RFP-B И pTURBO YFP-B В ПРИРОДНЫХ СРЕДАХ

ASSESSMENT OF THE SURVIVAL AND PRESERVATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* XL-1 CULTURES CONTAINING PLASMID VECTORS pTURBO GFP-B, pTURBO RFP-B AND pTURBO YFP-B IN NATURAL ENVIRONMENTS

Реут Елизавета Сергеевна
бакалавр
email: reutelizaveta9@gmail.com

Reut Elizaveta Sergeevna
Bachelor student
email: reutelizaveta9@gmail.com

Самков Андрей Александрович
канд.биол.наук, доцент

Samkov Andrey Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., Associate Professor

Палагутина Евгения Егоровна
бакалавр

Palagutina Evgeniya Egorovna
Bachelor student

Дурнева Виктория Владимировна
бакалавр

Durneva Victoria Vladimirovna
Bachelor student

Волченко Никита Николаевич
канд.биол.наук, доцент

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci., Associate Professor

Моисеева Елена Владимировна
лаборант

Moiseeva Elena Vladimirovna
laboratory assistant

Круглова Мария Николаевна
лаборант

Kruglova Maria Nikolaevna
laboratory assistant

Худокормов Александр Александрович
канд.биол.наук, доцент

Khudokormov Aleksandr Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., Associate Professor

Карасева Эмма Викторовна
канд.биол.наук, профессор
ФГБОУ ВО КубГУ «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci., Professor
Kuban State University, Krasnodar, Russia

Распространение генов антибиотикорезистентности представляет собой серьёзную проблему в области биобезопасности, здравоохранения и защиты окружающей среды. В статье отражена оценка жизнеспособности и сохранения антибиотикоустойчивости культур штамма *E. coli* XL-1, содержащих плазмидные вектора pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B в модельных образцах естественных сред – черноземной почвы и донных отложений пресного водоема. Выявлена предположительно неспособность указанных культур повысить антибиотикоустойчивость естественных представителей микробиоценозов, выделяемых на среде Эндо

The spread of antibiotic resistance genes is a serious problem in the field of biosafety, health and environmental protection. The article reflects the assessment of the viability and preservation of antibiotic resistance of cultures of the *E. coli* XL-1 strain containing the plasmid vectors pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B and pTurbo YFP-B – in model samples of natural environments – chernozem soil and bottom sediments of a freshwater reservoir. The alleged inability of these cultures to increase the antibiotic resistance of natural representatives of microbiocenoses isolated in the Endo agar has been revealed

Ключевые слова:
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ,
ТРАНСГЕННЫЕ БАКТЕРИИ,
ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Keywords: ANTIBIOTIC RESISTANCE,
TRANSGENIC BACTERIA, FLUORESCENCE

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-200-024>

Введение. Устойчивость к антибиотикам патогенных микроорганизмов человека – серьёзная проблема в области здравоохранения. Способность адаптации к условиям окружающей среды микроорганизмов, а именно генетические мутации, направленные против действия антибиотиков, горизонтальная передача данных генов между различными видами бактерий приводят к длительным заболеваниям, проблемам лечения, разработке новых более совершенных и сложных препаратов против патогенов [2].

Бесконтрольная передача генов антибиотикоустойчивых бактерий в естественной среде ведёт к ее загрязнению, нарушению экологического состояния и возникновению суперпатогенов в основном в местах сброса антибиотиков в составе органических или иных веществ. Множественную лекарственную устойчивость и потенциальные патогенные бактерии можно наблюдать в больничной и канализационных системах, в сточных водах молочных ферм [6,3]. На очистных сооружениях в Наньине (Китай) наблюдалась множественная антибиотикорезистентность (92,9%), самый высокий уровень антибиотикорезистентности у *Klebsiella* [4].

Для отслеживания экспрессии гена антибиотикорезистентности или иного интересующего гена, наблюдения за его функциями и механизмами экспрессии используют множество методов, одним из распространенных является метод вводимых в вектор генов флуоресцентных белков. Флуоресценция – физическое явление, суть которого заключается в кратковременном поглощении кванта светом флуорофором (веществом,

способным флуоресцировать) с последующей быстрой эмиссией другого кванта, который имеет свойства, отличные от исходного [5].

Материалы и методы. В качестве объекта исследования гена ампициллина устойчивости использовалась бактерия *Escherichia coli* – грамотрицательная палочковидная, часто используемая бактерия в качестве модельного организма в лаборатории как доступный, простой в культивировании, с высокой интенсивностью роста, с коротким репродуктивным периодом микроорганизм [1].

Для визуализации наличия гена ампициллина устойчивости использовался метод флуоресцентных белков. Были использованы плазмидные вектора: зеленый – pTurbo GFP-B, красный – pTurbo RFP-B и желтый – pTurbo YFP-B.

Производилось внесение изучаемых культур антибиотикорезистентных *E. coli* XL-1 в естественную среду обитания микроорганизмов – чернозём с территории КубГУ (Краснодар) и ил с озера Карасун по 13 мл клеточной суспензии в одинаковой пропорции на 400 грамм образца (рисунок 1). Конечная концентрация составляла $3,25 \cdot 10^{10}$.

Выравнивание образцов перед внесением производилось по оптической плотности на приборе КФК-2МП (калориметр фотоэлектрический концентрационный) при длине волны 670 нм. Показатели оптической плотности варьировали в пределах 2,173-2,416.

Для оценки устойчивости штаммов микроорганизмов к антибиотику производился высев методом реплик с использованием металлического штампа на среду Эндо (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии») с добавлением концентраций антибиотика 0, 50, 100, 200 и 400 мкг/мл. В качестве антибиотиков использовались «Бициллин-5» (ОАО «Синтез»), «Ампициллин+сульбактам» (ПАО «Красфарма») и «Ампициллин» (РУП «Белмедпрепараты»), концентрация препарата рассчитывалась по

действующему веществу. Высев производился газоном, суспензии клеток разводились физраствором (натрия хлорид).

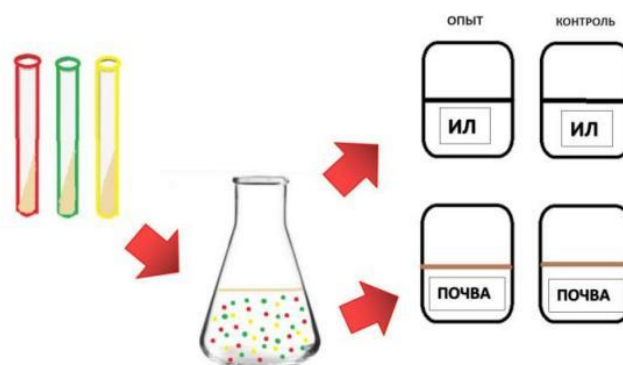


Рисунок 1 – схема внесения культур *E.coli*, содержащих плазмидные вектора pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B в почву и ил

Результаты и обсуждение.

Оценка ампицилиноустойчивости штаммов *Escherichia coli*.

Была проведена оценка устойчивости культур *E. coli* XL-1 с различными маркерными генами к концентрациям 0, 50, 100, 200 и 400 мкг/мл «Бициллин-5», «Ампициллин+сульбактам», «Ампициллин» (см. таблицу).

Таблица – Влияние концентрации антибиотиков «Ампициллин + сульбактам», «Бициллин-5» и «Ампициллин» на штамм *E. coli* XL-1 в зависимости от антибиотка и плазмидного вектора культуры

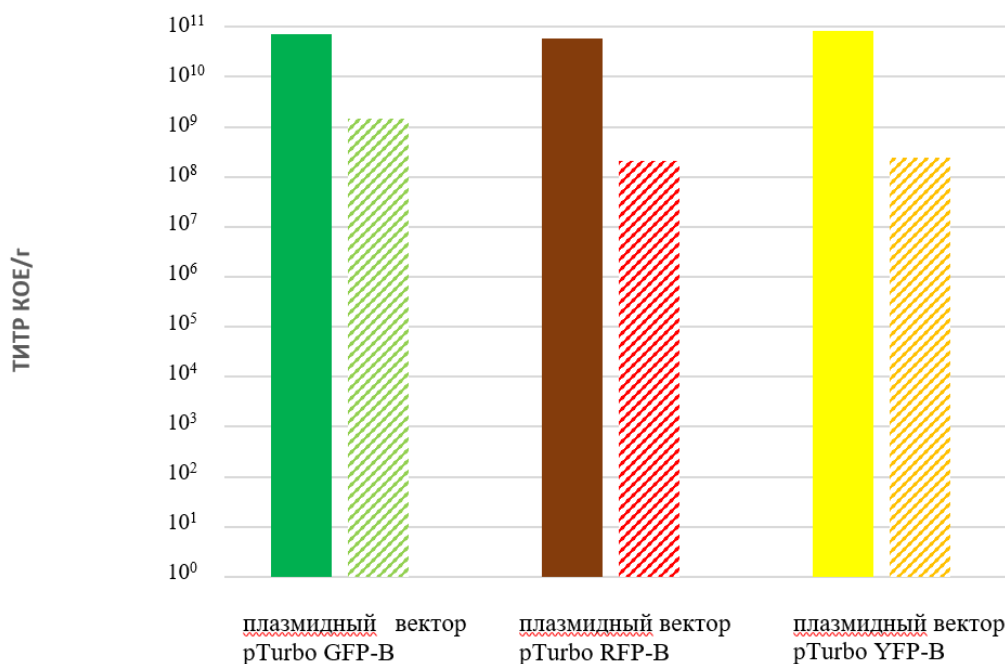
Антибиотик / плазмидный вектор	Концентрация антибиотика, мкг/мл				
	0	50	100	200	400
Бициллин-5 / pTurbo GFP-B	+	+	+	+	+
Бициллин-5 / pTurbo RFP-B	+	+	+	+	+
Бициллин-5 / pTurbo YFP-B	+	+	+	+	+
Ампициллин+сульбактам / pTurbo GFP-B	+	+	+	+/-	-
Ампициллин+сульбактам / pTurbo RFP-B	+	+	+	+	-
Ампициллин+сульбактам / pTurbo YFP-B	+	+	+	+	-
Ампициллин / pTurbo GFP-B	+	+	+	+	+
Ампициллин / pTurbo RFP-B	+	+	+	+	+
Ампициллин / pTurbo YFP-B	+	+	+	+	+

+ наблюдается рост, - роста нет, +/- рост слабо выражен.

Резистентность к «Бициллин-5» и «Ампициллин» была максимальной для всех культур штамма *E. coli* XL-1. Наблюдалась устойчивость к «Ампициллин+сульбактам» в концентрации 200 мкг/мл. Для дальнейших исследований был выбран антибиотик «Ампициллин+сульбактам» для оценки устойчивости штаммов в оптимальной концентрации 200 мкг/мл, так как мы видим не стойкую резистентность данному препарату. В последующем эксперименте можно отметить предположительную деградацию культур в условиях естественной среды. Была отмечен лактозаотрицательный фенотип штамма *Escherichia coli* XL-1.

Оценка жизнеспособности культур трансгенной *Escherichia coli* XL-1 в естественной среде обитания микроорганизмов.

Было сделано внесение в почву и ил (400 г) смеси культур штамма *Escherichia coli* XL-1, содержащих плазмидные вектора pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B, в одинаковой пропорции смыв 13 мл, в контрольные образцы вносился дистиллят 13 мл. Титры исходных смывов приведены на рисунке 2. Наблюдалось некоторое снижение жизнеспособности *E. coli*, содержащих плазмидные вектора pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B на среде Эндо с антибиотиком (концентрация 200 мкг/мл) (см. рисунок 2). Несмотря на устойчивость данных культур к 200 мкг/мл ампициллину, Эндо с антибиотиком дало меньший титр для всех культур, что может говорить о возможной частичной элиминации плазмид или отсутствии экспрессии гена бета-лактамазы в составе вектора у части использованных для посева клеток.



Сплошная заливка – Эндо без антибиотика, заливка штриховка – Эндо с антибиотиком

Рис 2 – Титры культур *E. coli* XL-1, содержащих плазмидные вектора pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B на среде Эндо с антибиотиком (концентрация 200 мкг/мл) и без антибиотика

После высева на среду с антибиотиком экспрессия культурами штамма *E. coli* XL-1, содержащими плазмидные вектора, демонстрируется на примере pTurbo RFP-B свечением флюоресцентного белка RFP при облучении УФ (см. рисунок 3).

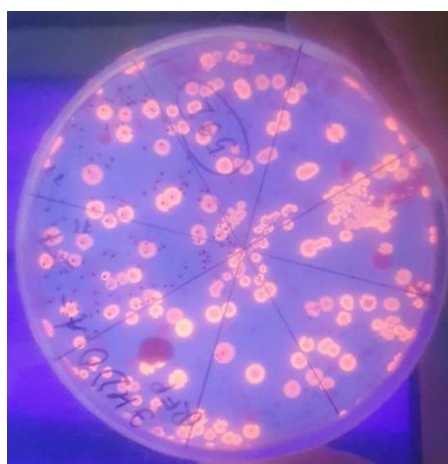


Рис 3 – Свечение колоний *E. coli* XL-1, содержащих плазмидный вектор pTurbo RFP-B

Через 7 суток после инкубации почвы и донных отложений, инокулированных культурами штамма *E. coli* XL-1, содержащими плазмидные вектора, из опытных и контрольных образцов были сделаны посевы на Эндо, в том числе, с ампициллином 200 мкг/мл.

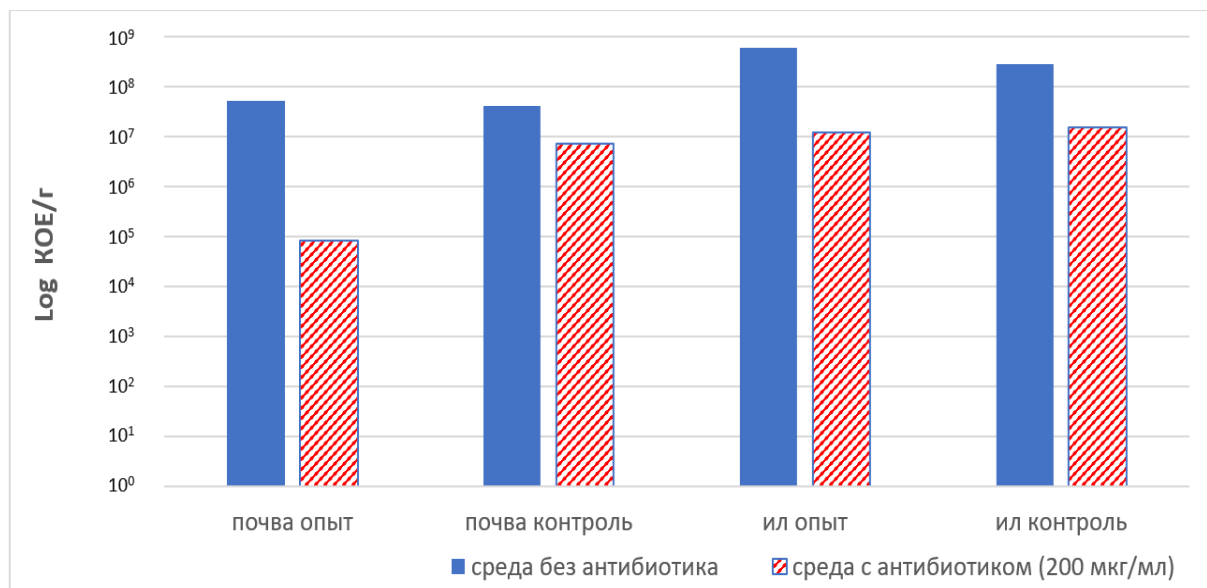


Рис 4 – КОЕ образцов ила и почвы (опыт с внесением культур *Escherichia coli* XL-1 и контроль) на среде Эндо с антибиотиком (концентрация 200 мкг/мл) и без антибиотика

Во всех исследуемых образцах почвы и ила ранее были обнаружены естественные антибиотикорезистентные микроорганизмы $1,5 \cdot 10^7$ титр КОЕ/г в иле и $7 \cdot 10^6$ титр КОЕ/г в почве, а также естественная не устойчивая к антибиотикам микрофлора, потенциально способная стать реципиентом генетических конструкций из *E. coli* XL-1 (см. рисунок 4).

Наибольший титр энтеробактерий наблюдался в иле озера Карасун, включая антибиотикорезистентные формы. Не видно выраженной разницы между опытным и контрольным образцом по свечению, однако в опытном образце ила преобладал штамм *E. coli* XL-1, содержащий плазмидный вектор pTurbo RFP-B (красное свечение), что говорит о жизнеспособности данного штамма в естественной среде обитания в виде ила.

В почве при добавлении смеси культур *E. coli* значительно снизился титр антибиотикорезистентной микрофлоры по отношению к контролю, что может говорить о возможной конкуренции или антагонизме аборигенных и аллогенных (внесенных в качестве экспериментального фактора) ампициллинрезистентных энтеробактерий.

Образцы были подвергнуты высушиванию, часто сопровождающему обработку отходов на площадках биологической очистки.

Через месяц после начала эксперимента производился повторный высеv из почвы и ила по приведённой выше схеме. Наблюдался активный рост грибов, титр энтеробактерий резко снизился до $1,2 \cdot 10^5$ титр КОЕ/г, устойчивых штаммов к антибиотикам не наблюдалось. Можно предположить, что в естественных условиях трансгенные культуры потеряли антибиотикоустойчивость как и естественные устойчивые микроорганизмы, приспособившись к условиям среды, предположительно в результате исчерпания питательных ресурсов в виде небольших доз антибиотических средств в естественной среде и вытеснения из ниши грибными микроорганизмами и другими видами бактерий, которые наблюдались в подавляющем большинстве при высеve на среду.

Заключение. В данных экспериментальных условиях выявлена предположительно неспособность культур штамма *Escherichia coli* XL-1, содержащих плазмидные векторы pTurbo GFP-B, pTurbo RFP-B и pTurbo YFP-B повысить антибиотикоустойчивость естественных представителей микробиоценоза донных отложений, практически всегда содержащих протеобактерий. В долгосрочной перспективе, после внесения штамма *E. coli* XL-1, было отмечено снижение антибиотикорезистентности бактериальной микрофлоры и усиление роста микромицетов.

Литература

1. Кони́чев, А. С. Молекулярная биология : учебник для среднего профессионального образования / А. С. Кони́чев, Г. А. Севастьянова, И. Л. Цветков. – 5-е изд. – Москва : Издательство Юрайт. – 2024. – 422 с.
2. Zhenchao Z. , Hong C. Evaluating human exposure to antibiotic resistance genes / Biosafety and Health. – 2024. – Vol 465. – P. 133422.
3. Rui X., Kuangjia L., Yongzhen D., Keqiang Z., Mengyuan Q., Xian J., Penglin F., Ruoqing L., Kai Z., Fengxia Y. Tracking the extracellular and intracellular antibiotic resistance genes across whole year in wastewater of intensive dairy farm // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2024. – Vol. 269. – P. 115773.
4. Luoyao W., Yunwei C., Luodong H., Chunzhong W., Gangan W., Junya Z., Yanbo J., Yuansong W., Peihong S. Changes of composition and antibiotic resistance of fecal coliform bacteria in municipal wastewater treatment plant // Journal of Environmental Sciences. – 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.09.012>.
5. Ephantus J M. , Jose L R., Chang-Hyun K. Green, Yellow, and Red Fluorescent Proteins as Markers for Bacterial Isolates from Mosquito Midguts // Insects. – 2019. – Vol. 10, Is. 2. – P. 1–9.
6. Xinyi S., Zhenchao Z., Lin Z., Chioma A., Zejun L., Zhe L., XiYu, JinyuZ., Yanhan L., Hong C. Ranking the risk of antibiotic resistance genes by metagenomic and multifactorial analysis in hospital wastewater systems // Journal of Hazardous Materials. – 2024. – Vol. 468. – P. 133790.

References

1. Konichev, A. S. Molekuljarnaja biologija : uchebnik dlja srednego professional'nogo obrazovanija / A. S. Konichev, G. A. Sevast'janova, I. L. Cvetkov. – 5-e izd. – Moskva : Izdatel'stvo Jurajt. – 2024. – 422 s.
2. Zhenchao Z. , Hong C. Evaluating human exposure to antibiotic resistance genes / Biosafety and Health. – 2024. – Vol 465. – P. 133422.
3. Rui X., Kuangjia L., Yongzhen D., Keqiang Z., Mengyuan Q., Xian J., Penglin F., Ruoqing L., Kai Z., Fengxia Y. Tracking the extracellular and intracellular antibiotic resistance genes across whole year in wastewater of intensive dairy farm // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2024. – Vol. 269. – P. 115773.
4. Luoyao W., Yunwei C., Luodong H., Chunzhong W., Gangan W., Junya Z., Yanbo J., Yuansong W., Peihong S. Changes of composition and antibiotic resistance of fecal coliform bacteria in municipal wastewater treatment plant // Journal of Environmental Sciences. – 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.09.012>.
5. Ephantus J M. , Jose L R., Chang-Hyun K. Green, Yellow, and Red Fluorescent Proteins as Markers for Bacterial Isolates from Mosquito Midguts // Insects. – 2019. – Vol. 10, Is. 2. – P. 1–9.
6. Xinyi S., Zhenchao Z., Lin Z., Chioma A., Zejun L., Zhe L., XiYu, JinyuZ., Yanhan L., Hong C. Ranking the risk of antibiotic resistance genes by metagenomic and multifactorial analysis in hospital wastewater systems // Journal of Hazardous Materials. – 2024. – Vol. 468. – P. 133790.