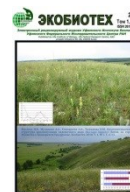




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



РАСПРОСТРАНЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПУТЕМ ЕСТЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Ступак Е.Э., Кузьмина Л.Ю.

Уфимский Институт биологии Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа,
E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Распространение генов и генных сетей путем горизонтального переноса позволяет приспособиться микроорганизмам к изменяющимся условиям среды. Одним из неблагоприятных для человека примеров адаптации бактерий к новым условиям среды является развитие устойчивости к антибактериальным препаратам. Горизонтальный перенос генов между микроорганизмами обеспечивается несколькими механизмами, одним из которых является трансформация – захват фрагментов ДНК непосредственно из внешней среды.

В данной работе исследовалась возможность горизонтального переноса генов антибиотикоустойчивости в клетки *Pseudomonas mandelii* путем трансформации. Обнаружена возможность естественной трансформации клеток данного штамма плазмидой pBR325 из лизата клеток *Escherichia coli* в воде. Селекция трансформантов в жидкой среде обеспечивает лучшие результаты, по сравнению с селекцией на агаризованной среде. Последующее культивирование в присутствии тетрациклина обеспечивает стабильное наследование плазмиды в ряду клеточных поколений с сохранением других плазмидных детерминант устойчивости к антибиотикам.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, горизонтальный перенос генов, естественная трансформация, *Pseudomonas mandelii*

SPREADING OF ANTIBIOTIC DRUG RESISTANCE BY NATURAL TRANSFORMATION

Stupak E.E., Kuzmina L.Yu.

Ufa Institute of biology of the Ufa Federal Research
Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa,
E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Spreading of genes and gene networks by means of horizontal transfer enables adaptation of microorganisms to the changing environment. One of examples of bacteria adaptation that is detrimental for people is the development of their resistance to antibacterial drugs. Horizontal gene transfer between microorganisms is enabled through several mechanisms, one of which is transformation – the seizure of DNA fragments directly from the environment.

In this paper we investigated the possibility of horizontal transfer of genes of antibiotic resistance into *Pseudomonas mandelii* cells by transformation. Natural transformation of the given strain cells by the plasmid pBR325 from the lysate of *Escherichia coli* cells in sterile water was found to be possible. Selection of transformants in the liquid medium provides better results in comparison to the selection in the agarized medium. The subsequent cultivation in the presence of tetracycline enables stable inheritance of plasmid in the succession of cell generations, preserving other determinants of antibiotic resistance.

Keywords: antibiotic drug resistance, horizontal gene transfer, natural genetic transformation, *Pseudomonas mandelii*

Поступила в редакцию: 13.03.2018

DOI: 10.31163/2618-964X-2018-1-1-39-44

ВВЕДЕНИЕ

Присутствие в микробных сообществах генов устойчивости к антибиотикам связано с широко распространенной среди микроорганизмов стратегией синтеза этих веществ для борьбы с конкурентами. Так предполагают, что β-лактамазы появились более 2 млрд. лет назад [Hall, Barlow, 2004]. Встречается и устойчивость к синтетическим антибиотикам, которую обеспечивают гены, отвечающие в бактериях за другие функции [Martinez, Vaquero, 2014]. Широкое применение в медицине, животноводстве и растениеводстве антибактериальных препаратов привело к быстрому росту числа устойчивых штаммов как

среди клинически значимых микроорганизмов, так и природных популяциях. Например, в изолированных природных экосистемах, таких как пещеры, только 2% микроорганизмов показывают устойчивость к фторхинолонам, в то время как на станциях очистки сточных вод фармпроизводств в Индии 62% устойчивы к ципрофлоксацину [Marathe et al., 2013].

Возникновение устойчивости к антибиотикам может быть как результатом индуцируемого их воздействием мутагенеза [Gutierrez et al., 2013], так и следствием переноса генов от устойчивых микроорганизмов. Горизонтальный перенос генов представляет собой получение генетического материала клетками-реципиентами от донора путем конъюгации, трансфекции или трансформации с последующим его наследованием путем автономной репликации или интеграции в хромосому [Van Elsas, 2003]. Считается, что в современных условиях, это наиболее значимый путь развития антибиотикоустойчивости бактерий [Aminov, 2009].

Молекулы ДНК постоянно присутствуют в среде в результате гибели организмов и, несмотря на повреждение нуклеазами, могут сохраняться в почве несколько месяцев, частично сохраняя способность к трансформации [Demaneche, 2001]. Короткие фрагменты в определенных условиях могут сохраняться в окружающей среде тысячи и даже миллионы лет [Overballe-Petersen et al, 2013].

Для трансформации необходим переход клетки в компетентное состояние, в котором возможно поглощение внешней ДНК. К настоящему времени естественная компетентность описана у десятков видов бактерий, включая несколько видов, имеющих клиническое значение. Доля клеток популяции, способных поглощать ДНК (компетентных клеток), различна для разных видов и может достигать 100% (например, у *Azotobacter vinelandii* и *Haemophilus influenzae*) [Bakkali, 2013]. В состоянии компетентности клетки после связывания ДНК осуществляют деградацию экзонуклеазами ее 3'-нити одновременно с переносом 5'-нити в клетку, где она либо расщепляется, либо восстанавливается до внехромосомных элементов, либо встраивается в хромосому [Chen, 2005]. Некоторые виды способны захватывать любую ДНК в том числе и синтетическую [Domingues et al, 2012], другие зависят от соответствия систем рестрикции-модификации, требуют наличия определенных коротких последовательностей или специфического метилирования ДНК [Beauchamp et al, 2017].

Естественную трансформацию, как правило, связывают с пиями типа IV, которые обеспечивают адгезию и подвижность бактерий. Пили этого типа образуются в результате полимеризации субъединиц пилина и секретируются на поверхность клетки. Движение происходит в результате чередования образования пили, адгезии ее концевой части к поверхности и последующей деполимеризации [Bakkali, 2013].

В данной работе была исследована антибиотикоустойчивость штамма *Pseudomonas mandelii* ИБ-Ki14 выделенного из спелеосистемы и возможность естественной трансформации клеток данного штамма плазмидной ДНК из лизата клеток *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *Escherichia coli* JC158 (*Hfr P01, thi1, serA6, lacI22, relA1*), полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика) и штамм *Pseudomonas mandelii* ИБ-К14, выделенный из грунта пещеры Киндерлинская, Южный Урал (зал Классический, 930 м от входа). Плазмида pBR325 несет гены устойчивости к ампициллину, тетрациклину и хлорамфениколу [Bolivar, 1978].

Культуры выращивали на среде LB [Миллер, 1976], при температуре 37°C в случае *E.coli*, при 28°C для *P. mandelii*, в присутствии необходимых антибиотиков. Ампициллин вносили в среду в концентрации 100 мкг/мл, тетрациклин – 20 мкг/мл, хлорамфеникол – 20 мкг/мл.

Антибиотикоустойчивость штамма *P. mandelii* ИБ-К14 изучали с использованием дисков с антибиотиками или внесением препаратов в питательную среду. Для тестирования устойчивости высевали 0.1 мл 24 ч культуры с титром 10^7 - 10^8 КОЕ/мл. Чашки инкубировали при 28°C в течение 6 суток.

Клетки *E.coli* трансформировали плазмидой pBR325 в присутствии CaCl_2 [Маниатис и др., 1984].

Для проведения естественной трансформации 3 мл среды засеивали клетками единичной колонии и выращивали 12 часов, затем 100 мкл пересевали в свежую среду, подращивали до оптической плотности $D_{600}=0,6$ и осаждали центрифугированием. Отмывали клетки от среды стерильной дистиллированной водой, вновь осаждали. Осадок ресуспендировали в 100 мкл воды. Лизат получали помещая замороженную при -20°C сконцентрированную культуру JC158(pBR325) на 3 минуты в водяную баню при 100°C. Затем смешивали клетки-реципиенты с лизатом в равных количествах и оставляли на сутки при температуре 25°C. Для выявления трансформантов клетки высевали на чашки с LB агаром, содержащим тетрациклин. Кроме того, часть образцов высевали в жидкую среду LB, также содержащую тетрациклин, и культивировали при 25°C без качания, а через сутки рассеивали штрихом на чашки с LB агаром, содержащим тот же антибиотик.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [Маниатис и др., 1984].

ПЦР проводили с праймерами ТААСССТGATAAATGCTTCAA и ААСТТGGTCTGACAGTTACCA к гену β -лактамазы, локализованному на плазмиде pBR325, а также с праймером CAGGGCAACTCTCCTTTGGC для идентификации клеток *E.coli* и *P. mandelii*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии рода *Pseudomonas* часто имеют устойчивость к противомикробным препаратам и дезинфицирующим средствам. В значительной мере устойчивость определяется низкой проницаемостью внешней мембраны, синтезом β -лактамаз и системами вывода антибиотиков из клетки. Кроме того предполагается, что пластичность генома *Pseudomonas* spp. позволяет приобрести почти все известные противомикробной

резистентности. Дополнительную защиту от противомикробных средств обеспечивает способность псевдомонад к образованию биопленок. [Luczkiewicz et al, 2015].

Как показали эксперименты, *Pseudomonas mandelii* ИБ-К14 обладает устойчивостью к ампициллину (до 200 мкг/мл), хлорамфениколу (30 мкг/мл), а также к низким концентрациям стрептомицина (10 мкг/мл) и рифампицина (5 мкг/мл). Особенностью данного штамма было бактерицидное действие триклозана, как правило, избирательно ингибирующего грамположительные и грамотрицательные бактерии, отличные от видов *Pseudomonas* [MacFaddin, 1985]. На основе данного антибиотика разработана питательная среда для выделения бактерий этого рода (*Pseudomonas Isolation Agar*, фирмы Difco и Himedia), однако штамм *P. mandelii* К14 не растет на этой среде. Очевидно, триклозан оказывал бактерицидное действие на штамм *P. mandelii* К14, ингибируя синтез клеточной стенки и подавляя синтез жирных кислот. Тетрациклин ингибировал рост *P. mandelii*, однако при концентрации 10 мкг/мл на 4 день наблюдалось появление антибиотикоустойчивых клеток с частотой 10^{-8} , предположительно в результате мутагенеза.

Поскольку отбор трансформантов предполагали проводить по устойчивости к тетрациклину, был проведен эксперимент по выявлению возможности появления устойчивых к тетрациклину мутантов за время трансформации и последующей селекции. Для этого лизат культуры JC158(pBR325) был заменен при проведении трансформации на лизат бесплазмидного штамма JC158. При последующем посеве как на агаризованную среду, так и в жидкую среду с тетрациклином, роста культуры не наблюдалось.

Клетки разных видов *Pseudomonas* переходят в состояние компетентности в разных условиях. Так, *P. fluorescens* компетентна в почве, но не проявляет компетентности в лабораторных условиях [Demaneche, 2001]. У *P. stutzeri* развитию компетентности способствуют среды с ограниченными источниками углерода или с дефицитом азота и фосфора [Bakkali, 2013]. Штамм *P. mandelii* ИБ-К14, как показали эксперименты по внесению лизата JC158(pBR325) в культуру клеток, способен к естественной трансформации в стерильной воде. Бесплазмидный штамм *E.coli* JC158 в данных условиях лизатом не трансформировался, как и ожидалось, поскольку клеткам *E.coli* для перехода в компетентное состояние требуют физического и химического воздействия. Соответственно, наблюдаемая нами трансформация не связана с изменением проницаемости мембран.

При непосредственном рассеивании на чашки со средой, содержащей тетрациклин, трансформация *P. mandelii* наблюдалась в 40 % повторностей с частотой до 10^{-9} . При посеве трансформантов в жидкую среду с антибиотиком трансформация наблюдалась во всех образцах. Клетки трансформантов, полученных как непосредственным рассеиванием, так и при предварительной инкубации в жидкой среде, содержали плазмиду с молекулярным весом соответствующим pBR325.

При последующем культивировании в среде, содержащей тетрациклин, плазида стабильно наследовалась и обеспечивала устойчивость к данному антибиотику до концентрации 40 мг/мл. Известно, что в случае если гены устойчивости собраны в одном генетическом элементе (плазмиде, транспозоне, генной кассете), устойчивость к антибиотику может сохраняться даже после прекращения его применения. В данном случае,

несмотря на то, что плазмидный ген устойчивости к ампициллину не был востребован, было показано, что он не теряется и также присутствует в клетке, являясь удобным маркером для быстрого скрининга клеток на наличие плазмиды (Рис. 1).

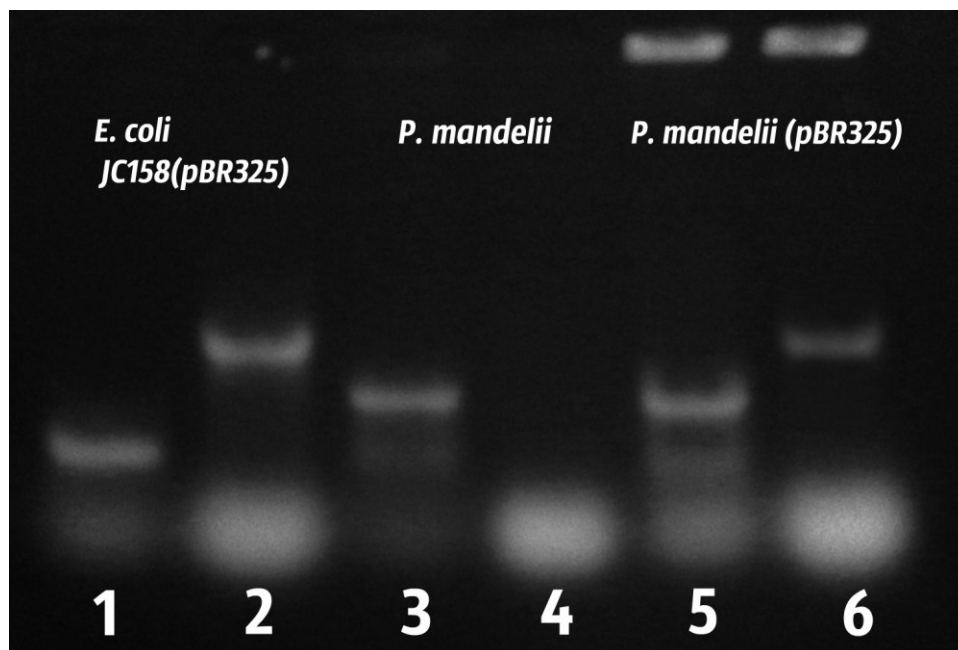


Рис. 1 ПЦР анализ штаммов *E. coli* JC158(pBR325) и *P. mandelii* ИБ-Ки14.
1, 3, 5 – ПЦР с 20 нуклеотидным праймером для идентификации бактерий;
2, 4, 6 – ПЦР с праймерами к гену β -лактамазы.

Таким образом, штамм *Pseudomonas mandelii* ИБ-Ки14 способен к естественной трансформации в воде. Стабильные результаты наблюдаются при высеве трансформантов в жидкую среду с антибиотиком без качания. Также наши результаты показывают, что естественная трансформация плазмидной ДНК позволяет поддерживать и распространять множественную антибиотикоустойчивость, даже если не все гены востребованы в конкретной бактерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
3. Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature // *Environmental Microbiology*. 2009. V.11 (12). P. 2970-2988.
4. Bakkali M. Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? // *Archives of Microbiology*. 2013. V. 195 (4). P. 279-289. doi:10.1007/s00203-013-0870-1.
5. Beauchamp J. M., Leveque R.M., Dawid S., DiRita V. J. Methylation-dependent DNA discrimination // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. 201703331. doi:10.1073/pnas.1703331114.
6. Bolivar F. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules // *Gene*. 1978. V. 4. P. 121–136. doi:10.1016/0378-1119(78)90025-2.
7. Chen I., Christie P.J., Dubnau D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria // *Science*. 2005. V. 310. P. 1456–1460.

8. Demaneche S., Kay E., Gourbiere F., Simonet P. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil // Applied and Environmental Microbiology. 2001. V. 67 (6). P. 2617-2621. doi:10.1128/AEM.67.6.2617-2621.2001.
9. Domingues S, Harms K, Fricke W.F., Johnsen P.J., da Silva G.J., Nielsen K.M.. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species // PLoS Pathogens. 2012. V. 8 (8). e1002837. doi:10.1371/journal.ppat.1002837.
10. Gutierrez A., Laureti L., Crussard S., Abida H., Rodríguez-Rojas A., Blázquez J., Baharoglu Z., Mazel D., Darfeuille F., Vogel J., Matic I. β -lactam antibiotics promote mutagenesis via RpoS-mediated replication fidelity reduction // Nat. Commun. 2013. V. 4. doi:10.1038/ncomms2607.
11. Hall B.G., Barlow M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future // Drug Resist Updat. 2004. V. 7. P. 111–123.
12. Luczkiewicz A., Kotlarska E., Artichowicz W., Tarasewicz K., Fudala-Ksiazek S. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone // Environmental Science and Pollution Research International. 2015. V. 22. P.19823-19834. doi:10.1007/s11356-015-5098-y
13. MacFaddin J.F. Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore, London. 1985. Volume 1.
14. Marathe N.P., Regina V.R., Walujkar S.A., Charan S.S., Moore E.R.B. Larsson D.G.J., Shouche Y.S.A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria // PLOS ONE. 2013. V. 8(10): e77310. doi:10.1371/journal.pone.0077310.
15. Martinez J.L., Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space // Upsala Journal of Medical Sciences. 2014. V. 119. P. 68–77.
16. Overballe-Petersen S., Harms K., Orlando L.A.A., Mayar J.V.M., Rasmussen S., Dahl T.W., Rosing M.T., Poole A.M., Sicheritz-Ponten T., Brunak S., Inselmann S., Vries J., Wackernagel W., Pybus O.G., Nielsen R., Johnsen P.J., Nielsen K.M., Willerslev E. Bacterial natural transformation by degraded DNA // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. V. 110 (49). P. 19860-19865. doi:10.1073/pnas.1315278110
17. Van Elsas J. D., Turner S., Bailey M. J. Horizontal gene transfer in the phytosphere // New Phytologist, 2003. V. 157. P. 525–537. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00697.x