



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



СКРИНИНГ КОДИРУЮЩЕГО РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ТЕТРАЦИКЛИНУ ГЕНА *tetM* У БАКТЕРИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Адельгареева А.Ю.^{1,2}, Чижкова А.П.²,
Галаяутдинова Ю.А.², Стариков С.Н.¹,
Ступак Е.Э.¹, Петрова Д.Д.^{3,4}, Гатауллина А.И.^{3,4},
Маркушева Т.В.^{1,4*}

¹ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа

² Башкирский государственный университет, Уфа

³ Башкирский государственный педагогический университет
им. М. Акмуллы, Уфа

⁴ Учебно-научный центр БГПУ и УИБ УФИЦ РАН, Уфа
*E-mail: tvmark@anrb.ru

В настоящем исследовании проведен скрининг гена *tetM* у микроорганизмов промышленных экотопов Республики Башкортостан. В ходе ПЦР анализа последовательности, подобные кодирующему защиту рибосом гену *tetM*, были обнаружены у бактерий, отнесенных к роду *Xanthomonas*. В геномах протеобактерий родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Raoultella*, *Rhodococcus* и *Serratia* подобные *tetM* последовательности не обнаруживались.

Ключевые слова: ПЦР, тетрациклин, ген *tetM*, бактерия, техногенный экотоп

SCREENING OF ENCODING TETRACYCLINE RESISTANCE *tetM* GENE IN THE BACTERIA OF TECHNOGENIC ECOTOPES

Adelgareeva A.Yu.^{1,2}, Chizhkova A.P. ²,
Galyautdinova Yu.A.², Starikov S.N.¹,
Stupak E.E.¹, Petrova D.D.^{3,4}, Gataullina A.I.^{3,4},
Markusheva T.V.^{1,4*}

¹ Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa

² Bashkir State University, Ufa

³ Bashkir State Pedagogical University
named after M. Akmulla, Ufa

⁴ Educational and Scientific Center BSPU and UIB UFRC RAS
*E-mail: tvmark@anrb.ru

The *tetM* gene was screened in microorganisms of industrial ecotopes of the Republic of Bashkortostan. The *tetM* gene encoding the ribosome protection was detected by PCR in the bacteria of *Xanthomonas* genus. In the proteobacteria genomes of *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Raoultella*, *Rhodococcus* and *Serratia* genera *tetM*-like sequences were not found.

Keywords: PCR, tetracycline, gene *tetM*, bacteria, technogenic ecotope

Поступила в редакцию: 17.03.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-1-86-90](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-86-90)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что широкомасштабное применение противомикробных препаратов, принося огромную пользу в лечении воспалительных инфекционных заболеваний, несет и потенциальные риски из-за генерации и распространения генов резистентности к антибиотикам, достаточно быстро передающихся между микроорганизмами [Bryan, 1980]. В ряде исследований было показано, что сегодня серьезную угрозу представляют собой штаммы, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, приводящей к не только к снижению эффективности лечения, но и к продолжительному бактерионосительству [Fluit, 2001; Landers, 2012; Ventola, 2015].

В этом контексте важно отметить, что в последние пятьдесят лет значительные усилия были приложены к поискам новых соединений антимикробной химиотерапии, однако ни

один новый класс антибиотиков не был одобрен для грамотрицательных патогенов [Smith, 2018].

В свете растущей опасности последствий роста антибиотикорезистентности в настоящее время особое внимание уделяется изучению детерминант устойчивости к антибиотикам у клинических штаммов, а также микроорганизмов, присутствующих в бытовых и промышленных стоках, вместе с тем характер резистентности микромира антропогенных почв и грунтов остается во многом неизвестным.

Целью настоящего исследования являлся скрининг кодирующего резистентность к тетрациклину гена *tetM* у почвенных бактерий техногенных экотопов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовались штаммы бактерий, выделенные из почв и грунтов различных экотопов Уфимского промузла Республики Башкортостан, имеющих длительную историю химического производства (табл. 1). Классификация и определение основных физиолого-биохимических характеристик штаммов были осуществлены ранее [Zharikova, 2006, 2018; Korobov, 2006; Жарикова, 2009, 2011; Коробов, 2011, 2017; Журенко, 2012; Zhurenko, 2003; Маркушева, 2011].

Таблица 1. Объекты исследования

№	ШТАММ	ОБОЗНАЧЕНИЕ ЭКОТОПА	СЕМЕЙСТВО
1.	<i>Citrobacter sp. 36-4CPA</i>	ОАО «Дубитель»	<i>Enterobacteriaceae</i>
2.	<i>Gluconobacter oxydans IBRB-2T</i>	Шугуровка	<i>Acetobacteraceae</i>
3.	<i>Enterobacter sp. 38P</i>	ОАО «Дубитель»	<i>Enterobacteriaceae</i>
4.	<i>Raoultella planticola 33-4CPA</i>	NOVOIL, НУНПЗ	<i>Enterobacteriaceae</i>
5.	<i>Raoultella planticola 36D</i>	ОАО «Дубитель»	<i>Enterobacteriaceae</i>
6.	<i>Raoultella planticola 36T</i>	ОАО «Дубитель»	<i>Enterobacteriaceae</i>
7.	<i>Rhodococcus erythropolis 17S</i>	«Уфахимпром»	<i>Enterobacteriaceae</i>
8.	<i>Serratia marcescens 16</i>	«Уфахимпром»	<i>Yersiniaceae</i>
9.	<i>Serratia marcescens 22S</i>	«Уфахимпром»	<i>Yersiniaceae</i>
10.	<i>Xanthomonas sp. 33DCP</i>	NOVOIL, НУНПЗ	<i>Xanthomonadaceae</i>
11.	<i>Xanthomonas sp. 33D</i>	NOVOIL, НУНПЗ	<i>Xanthomonadaceae</i>

Для скрининга генов *tetM* применялся набор Резистом *tetM* (НПФ «Литех», г. Москва). Полимеразную цепную реакцию проводили согласно рекомендаций производителя в растворе, состоящем из 2,5 мкл реакционной смеси, 0,2 ед. Таq-полимеразы, 17,5 мкл разбавителя, в который добавляли 3 мкл лизата исследуемых бактериальных клеток.

Процесс амплификации осуществляли на термоциклере ТС 2720 (Applied biosystems, США) в условиях, предложенных НПФ «Литех», г. Москва (табл. 2).

Таблица 2. Режим амплификации гена *tetM*

№	СТАДИЯ	ТЕМПЕРАТУРА ИНКУБАЦИИ (°С)	ВРЕМЯ (сек)	КОЛИЧЕСТВО ЦИКЛОВ
1.	Предварительная денатурация	93	30	1
2.	Денатурация	93	10	
3.	Отжиг	57	10	35
4.	Элонгация	68	30	
5.	Финальная элонгация	68	60	1

По завершении ПЦР образцы смешивали с раствором 0,025% бромфенолового синего и 0,025% ксиленцианола в 5% глицерине, после чего их фракционировали с помощью горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле при напряжении электрического поля 6 В/см. Визуализацию ДНК осуществляли после инкубации геля в растворе 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Результаты фракционирования фрагментов протоколировали в проходящем ультрафиолетовом спектре (280 нм).

Положительное заключение о наличии подобных последовательностей делали при обнаружении целевого амплификата, устанавливаемого по маркеру длины фрагментов ДНК в диапазоне от 100 п.н. до 1000 п.н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Группа тетрациклинов объединяет близкие по своему строению соединения, проявляющие высокую активность в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых простейших. Бактерии способны к инактивации молекул тетрациклина путем окисления, однако отмечено, что большинство определяющих устойчивость к тетрациклину бактериальных генов кодирует механизм оттока молекул антибиотика из микробных клеток или рибосомную защиту. Кодированная генами *tetM* рибосомная защита реализуется через синтез белка, подобного фактору элонгации G, который, взаимодействуя с рибосомой, не препятствует синтезу новых белковых молекул, не давая тетрациклину ингибировать этот процесс.

Результаты поиска гена *tetM* у бактерий техногенных экотопов Уфимского промузла Республики Башкортостан показаны на рис. 1.

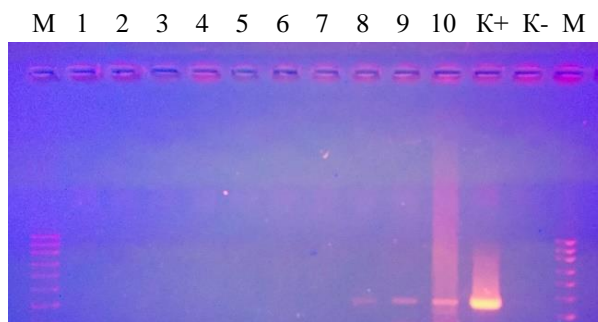


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных при использовании специфичных к гену *tetM* праймеров. Условные обозначения препаратов: М — маркер молекулярного веса; К⁺ — положительный контроль; К⁻ — отрицательный контроль; 1 – *Enterobacter* sp. 38P; 2 - *Raoultella planticola* 33-4CPA; 3 - *Raoultella planticola* 36D; 4 - *Citrobacter* sp. 36-4CPA; 5 - *Rhodococcus erythropolis* 17S; 6 - *Serratia marcescens* 16; 7 - *Serratia marcescens* 22S; 8 - *Xanthomonas* sp.; 9 - *Xanthomonas* sp. 33DCP; 10- *Xanthomonas* sp. 33D.

Из приведенных на рис. 1 результатов сравнительного ПЦР анализа следует, что у грамотрицательных изолятов промзоны г.Уфы, отнесенных к родам *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Raoultella*, *Rhodococcus* и *Serratia*, не обнаруживались целевые амплификаты с ожидаемым размером 407 п.н., что указывает на отсутствие в геномах изучаемых штаммов последовательностей, подобных гену *tetM*. Вместе с тем детекция *tetM* среди культур, отнесенных к роду *Xanthomonas*, обнаруживает последовательность, подобную последовательности гена *tetM*.

Обсуждая полученные данные следует принять во внимание то, что по информации NCBI присутствие гена *tetM* ранее отмечалось в геномах бактерий родов *Anaerostipes*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Holdemania*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Photobacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Наибольшее внимание исследователей привлекали представители грамотрицательных патогенных микроорганизмов родов *Enterococcus* и *Staphylococcus*. Вновь полученные экспериментальные данные согласуются с опубликованными ранее и дополняют их, свидетельствуя в пользу того, что представители рода *Xanthomonas* могут нести ген *tetM* и возможно реализуют стратегию резистентности к тетрациклину через механизм защиты рибосомных мишеней.

Результаты проведенных исследований способствуют лучшему пониманию особенностей организации механизмов антибиотикорезистентности у бактерий техносферы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Биоразнообразие бактерий – деструкторов хлорированных

- феноксикислот. // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6 (100). С. 121-123.
2. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В., Абрамов С.Н. Выделение и анализ биодеградационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus*. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 5-2. С. 169-171.
 3. Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Особенности антагонистических взаимодействий природных бактерий-деструкторов ароматических галогенидов. // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2012. № 3. С. 53-56.
 4. Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Особенности структуры микробиоты техногенной экосистемы северного промузла РБ: бактерии-деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола. // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. № 5-2. С. 172-174.
 5. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикислот гамма-подкласса протеобактерий. // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. № 5-2. С. 194-195.
 6. Bryan L. Mechanisms of plasmid mediated drug resistance. // Plasmids and Transposons. N.Y., 1980. P. 51-81.
 7. Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F. Molecular detection of antimicrobial resistance. // Clinical Microbiology Reviews. 2001. V. 14. P. № 4. P. 836-871.
 8. Korobov V.V., Markusheva T.V., Kusova I.V., E.Yu. Zhurenko, Galkin E.G., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R. A *Serratia marcescens* B-6493 strain that degrades phenol and 2,4-dichlorophenol. // Biotechnology in Russia. 2006. № 2. с. 82-87.
 9. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17s, for treatment of industrial wastewater. // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2017. T. 72. № 4. С. 201-205.
 10. Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L. // Public Health Rep. 2012. V. 127. № 1. P. 4-22.
 11. Smith P.A., Koehler M. F. T., Girgis H. S., Yan D., Chen Y., Optimized arylomycins are a new class of Gram-negative antibiotics. // Nature. 2018. V.561. P. 189-194.
 12. Ventola C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. // Pharmacy and Therapeutics. 2015. Apr; 40 (4). P. 277-283.
 13. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. Isolation and sequence analysis of PCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA. // Saudi Journal of Biological Sciences. 2018. T. 25. № 4. С. 660-671.
 14. Zharikova N.V., Markusheva T.V., Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Sitdikova L.R., Galkin E.G., Kolganova T.V., Kuznetsov B.B., Turova T.P. *Raoultella planticola*, a new strain degrading 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2006. T. 42. № 3. С. 258-262.
 15. Zhurenko E.Yu., Markusheva T.V., Galkin E.G., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T degrades 2,4,5-thrichlorophenoxyacetic acid. // Biotechnology in Russia. 2003. № 6. С. 75-80.