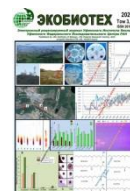




# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## СКРИНИНГ КОДИРУЮЩЕГО РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ХЛОРАМФЕНИКОЛУ ГЕНА *catA1* У БАКТЕРИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Адельгареева А.Ю., Стариков С.Н., Ступак Е.Э.,  
Маркушева Т.В.\*

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

\*E-mail: [tmarkusheva@gmail.com](mailto:tmarkusheva@gmail.com)

В настоящем исследовании проведен скрининг гена *catA1* у микроорганизмов промышленных экотопов Республики Башкортостан. В ходе ПЦР анализа в геномах бактерий родов *Aeromonas*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodococcus* и *Serratia* не были обнаружены последовательности, подобные кодирующему ферментативную инактивацию хлорамфеникола гену *catA1*.

**Ключевые слова:** ПЦР, хлорамфеникол, ген *catA1*, бактерия, техногенный экотоп

## SCREENING OF ENCODING CHLORAMPHENICOL RESISTANCE *catA1* GENE IN THE BACTERIA OF TECHNOGENIC ECOTOPES

Adelgareeva A. Yu., Starikov S.N., Stupak E.E.,  
Markusheva T.V.\*

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

\*E-mail: [tmarkusheva@gmail.com](mailto:tmarkusheva@gmail.com)

The *catA1* gene was screened in microorganisms of the Republic of Bashkortostan industrial ecotopes. Encoding antibiotic chloramphenicol enzymic inactivation *catA1* - like sequences were not found in the bacteria of the *Aeromonas*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodococcus* and *Serratia* genera.

**Keywords:** PCR, chloramphenicol, *catA1* gene, bacteria, technogenic ecotop

Поступила в редакцию: 15.12.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-4-722-726](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-722-726)

## ВВЕДЕНИЕ

Антибиотик хлорамфеникол (САР) группы фениколов, первоначально полученный из клеток *Streptomyces venezuelae*, был внедрен в клиническую практику с 1949 года для лечения опасных инфекций, вызванных *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*. Впоследствии было установлено, что молекулы САР способны ингибировать процесс синтеза белков у бактерий и выявлены механизмы резистентности к САР.

В ряде исследований также было отмечено то, что долговременное применение САР, как и других антибиотиков, приводит к существенному ускорению распространения генов антибиотикорезистентности (ARGs) среди членов различных экосистем [Peterson et al., 2018]. Сегодня феномен резистентности возбудителей инфекций к действию антибактериальных препаратов вызывает беспокойство из-за возможной высокой угрозы для здоровья человека, а ARGs рассматриваются в качестве нового загрязнителя окружающей среды [Tong et al., 2018].

Растущее число доказательств, свидетельствующих о том, что клиническая устойчивость к антибиотикам тесно связана с природными ARGs и их бактериальными носителями, делает понятным, что в современные исследования проблем ARGs должны быть вовлечены различные природные микроорганизмы, в том числе, подвергавшиеся техногенному воздействию, которое способно действовать как идеальная среда, увеличивающая скорость переноса генов среди живых систем [Ham et al., 2012; Motlagh et al., 2015].

Цель настоящего исследования – скрининг кодирующего ферментативную инактивацию хлорамфеникола гена *catA1* у выделенных из техногенных зон бактерий, отнесенных к различным таксономическим группам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись штаммы природных бактерий-деструкторов ароматических галогенидов, выделенные из образцов почвенных сообществ микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства на территории предприятий нефтехимического комплекса Республики Башкортостан.

Получение чистых культур осуществлялось по методу Коха с небольшими модификациями путем последовательных разведений суспензии почвенного образца. Классификация и определение основных физиолого-биохимических свойств бактерий, включая чувствительность микроорганизмов к CAP, были проведены ранее [Жарикова и др., 2011; Korobov и др., 2017; Zhurenko et al., 2003; Федорова и др., 2011; Коробов и др., 2013; Zharikova et al., 2018; Markusheva et al., 2004].

В ходе экспериментальной работы бактерии поддерживались на агаризованных и жидких средах LB и МПБ. Инкубирование культур проводилось в термостатированных условиях при температуре от 28 °С до 30 °С в течение 18—24 ч.

При приготовлении препаратов нуклеиновых кислот свежую биомассу культур перемещали бактериальной петлей с агаризованной среды в микропробирки и затем суспендировали в 50 мкл стерильной деионизированной воды. Полученную клеточную суспензию инкубировали в течении 10 мин при 95 °С и далее центрифугировали в течении 6 мин при 12000 об/мин. Для последующего ПЦР-анализа использовался супернатант, содержащий геномную ДНК бактерий.

ПЦР проводили с использованием набора праймеров генов *catA1*, кодирующих устойчивость к хлорамфениколу. Подбор праймеров (табл.1) проводили с учетом ранее проведенных исследований [Afzal et. al., 2013].

**Таблица 1. Характеристика набора праймеров**

Ген	Последовательность нуклеотидов и размер праймера 5' – 3'		Размер амплификатов, п.н.
	<i>catA1</i>	<i>catA1</i> -F <i>catA1</i> -R	

При проведении ПЦР в реакционную смесь общим объемом 20 мкл вносили 2 мкл 10x Taq буфера с KCl, 2 мкл dNTP (2 мМ), 1,1 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), по 1 мкл 10 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,5 ед. Taq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия), 2 мкл – ДНК-матрицы. Объем реакционной смеси доводили до 20 мкл деионизированной водой.

В качестве положительного контроля был выбран штамм *E.coli* HB 101, обладающий плазмидой pBR325, несущей ген резистентности к хлорамфениколу.

Аmplификацию гена *catA1* проводили с использованием термоциклера TC 2720 (Applied biosystems, США) в оптимальных условиях (табл.2).

Для сравнительного анализа амплификатов образцы смешивали с буферным раствором и далее пробы вносили в лунки 1,5%-ного агарозного геля. Продукты ПЦР фракционировали путем горизонтального электрофореза при напряжении электрического поля 6 В/см с ДНК-маркером длин от 1000 до 100 п.н.

Таблица 2. Условия проведения полимеразной цепной реакции

Стадия	Температура инкубации	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	94 °С	2 мин	1
Денатурация	94 °С	1 мин	
Отжиг	50 °С	1 мин	30
Элонгация	72 °С	1 мин	
Финальная элонгация	72 °С	5 мин	1

Визуализацию распределения молекул ДНК в агарозном геле проводили после 5-ти мин инкубации геля в растворе бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Результаты фиксировали в проходящем ультрафиолетовом спектре при 280 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ферментативная инактивация является широко используемой стратегией устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, включая аминогликозиды,  $\beta$ -лактамы и фениколы.

Фенотип бактериальной устойчивости к хлорамфениколу по механизму инактивации объясняется ацелированием молекул антибиотика, происходящим под действием фермента хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ) при использовании в качестве донора ацильных групп ацетил-КоА.

Предполагается, что САТ является продуктом древнего события дублирования генов при создании защиты от токсичных соединений, таких как САР [Biswas et al., 2012]. Ферментативную инактивацию молекул хлорамфеникола кодирует ген *catA1*, детерминирующий катализ переноса ацетила в САР с образованием 3-О-ацетил-САР.

В ходе настоящих исследований был осуществлен ПЦР скрининг генов *catA1* у вновь выделенных из техногенных экотопов культур, принадлежащих разным бактериальным таксонам, в частности родам *Aeromonas*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodococcus* и *Serratia*.

На рис. 1 приведены результаты фракционирования амплификатов ПЦР, полученных при использовании специфичных для гена *catA1* праймеров на матрицах геномной ДНК природных штаммов деструкторов хлорароматических кислот, имеющих фенотипические признаки резистентности к хлорамфениколу.

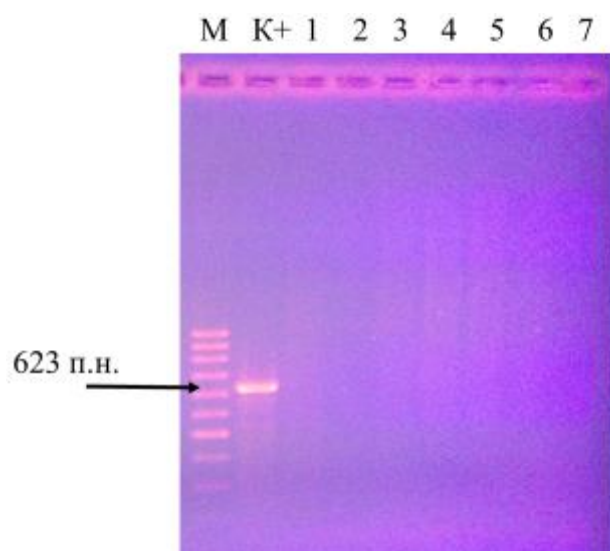


Рис. 1. Электрофореграмма амплификатов, визуализированных в ультрафиолетовом свете.

Условные обозначения: М – маркер длины фрагментов ДНК (100bp); К+ – положительный контроль ПЦР; образцы штаммов : 1 – *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4CPA ; 2 – *Bacillus subtilis* 16; 3 – *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T; 4 – *Serratia marcescens* B-6493; 5 – *Rhodococcus erythropolis* 17S; 6 – *Citrobacter* sp. 36-4CPA; 7 – отрицательный контроль ПЦР.

Полученные данные показывают, что при горизонтальном электрофорезе амплификатов ПЦР в 1,5%-ом агарозном геле не обнаруживались целевые амплификаты с ожидаемым размером 623 п.н., что указывает на отсутствие в геномах *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4CPA, *Agromyces* sp. IBRB-34DCP, *Bacillus subtilis* 16, *Citrobacter* sp. 36-4CPA, *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, *Rhodococcus erythropolis* 17S и *Serratia marcescens* B-6493 последовательностей, подобных гену *catA1*.

Принимая во внимание то, что у изучаемых представителей родов *Aeromonas*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodococcus* и *Serratia* наличие последовательностей, подобных кодирующему хлорамфениколацетилтрансферазу гену *catA1*, выявлено не было, следует отметить, что кроме механизма ферментативной инактивации резистентные к CAP бактерии могут обладать и иными механизмами устойчивости, среди которых может быть контроль за проницаемостью клеточной стенки, эффлюксом антибиотика, механизмы структурного изменения мишеней или продукции их альтернативных вариантов. Нельзя исключать и то, что различия в формировании антибиотикорезистентности могут быть опосредованы конкретными особенностями условий техногенных экотопов.

Результаты работы вносят понимание в вопросы распространения генов устойчивости к антибиотикам в современных экосистемах и могут быть востребованы в разработках частных методов мониторинга техногенных экотопов, направленных на решение проблемы сдерживания распространения антибиотикорезистентности микроорганизмов в окружающей среде.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Коробов В.В., Жарикова Н.В., Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Кусова И.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маркушева Т.В. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3-4. С. 1320–1322.
3. Федорова А.А., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Особенности процесса ассимиляции 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты *Bacillus subtilis* 16 // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. № 4-1 (37). С. 182–183.
4. Afzal A., Sarwar Y., Ali A., Maqbool A., Salman M., Habeeb M. A., Haque A. Molecular evaluation of drug resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhi from Pakistan // J. Infect. Dev. Ctries. 2013. V. 7. № 12. P. 929–940. DOI: 10.3855/jidc.3154

5. Biswas T., Houghton J., Garneau-Tsodikova S., Tsodikov O. The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CATI // *Protein Science*. V. 21. № 4. 2012. P. 520–530. [DOI: 10.1002/pro.2036](https://doi.org/10.1002/pro.2036)
6. Ham Y.S., Kobori H., Kang J.H., Matsuzaki T., Iino M., Nomura H. Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan // *Environ. Pollut.* V. 162. 2012. P. 98–103. [DOI: 10.1016/j.envpol.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.002)
7. 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. V. 72. № 4. C. 201–205. [DOI: 10.3103/S0096392517040083](https://doi.org/10.3103/S0096392517040083)
8. Markusheva T.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R., Galkin E.G. Identification and characterization of a plasmid in strain *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4CPA carrying genes for catabolism of chlorophenoxyacetic acids // *Russian Journal of Genetics*. 2004. V. 40. № 11. C. 1469–1474.
9. Motlagh A.M., Bhattacharjee, A.S., Goel, R. Microbiological study of bacteriophage induction in the presence of chemical stress factors in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) // *Water Research*. 2015. № 81. P. 1–14. [DOI: 10.1016/j.watres.2015.04.023](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.023)
10. Peterson E., Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. P. 1–21. [DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928)
11. Tong J., Tang A., Wang H., Liu X., Huang Z., Wang Z., Zhang J., Wei Y., Su Y., Zhang Y. Microbial Community Evolution and Fate of Antibiotic Resistance Genes along Six Different Full-Scale Municipal Wastewater Treatment Processes // *Bioresource Technology*. 2018. 46 p. [DOI: 10.1016/j.biortech.2018.10.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.079)
12. 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. V. 25. № 4. C. 660–671. [DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.014)
13. 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-trichlorophenoxyacetic acid // *Biotechnology in Russia*. 2003. № 6. C. 75–80.