ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ПЦР ДЕТЕКЦИЯ КОДИРУЮЩЕГО РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ТЕТРАЦИКЛИНУ ГЕНА *tetC* У БАКТЕРИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Чижкова А.П.[2,4], Галяутдинова Ю.А.[2,4], Ступак Е.Э.[1], Стариков С.Н.[1], Адельгареева А.М.[3], Петрова Д.Д.[2], Гатауллина А.И.[2], Маркушева Т.В.[1,4]

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН
[2] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа
[3] Башкирский государственный университет, Уфа
[4] Учебно-научный центр БГПУ им. М. Акмуллы и УИБ УФИЦ РАН, Уфа
E-mail: tvmark@anrb.ru

Методом ПЦР проведена детекция детерминирующего резистентность к тетрациклину гена *tet*C у почвенных бактерий, подвергавшихся долговременному воздействию нефтехимического производства Республики Башкортостан. Полученные данные свидетельствуют в пользу отсутствия последовательностей подобных гену *tet*C у представителей родов *Achromobacter, Agromyces, Arthrobacter, Bacillus, Citrobacter, Gluconobacter* и *Rhodococcus*. Результаты исследования могут быть применены в разработках методов очистки окружающей среды.

Ключевые слова: ПЦР, тетрациклин, ген *tetC*, бактерия, техногенный экотоп.

PCR DETECTION OF ENCODING TETRACYCLINE RESISTANCE *tet*C GENE IN THE BACTERIA OF TECHNOGENIC ECOTOPES

Chizhkova A.P.[2,4], Galyautdinova Yu.A.[2,4], Stupak E.E.[1], Starikov S.N.[1], Adelgareeva A.M.[3], Petrova D.D.[2], Gataullina A.I.[1,2], 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 Pedagogical University n.a. M. Akmulla, Ufa
[3] Bashkir State University, Ufa
[4] Educational and Scientific Center BSPU n.a. M. Akmulla and UIB UFRC RAS, Ufa
E-mail: tvmark@anrb.ru

PCR detection tetracycline resistance genes *tet*C of bacteria isolated from a population of soil microorganisms subjected to long-term exposure to chemical and petrochemical production of the Republic of Bashkortostan was carried out. The results indicate the absence of the sequences similar to the *tet*C gene sequences in representatives of *Achromobacter, Agromyces, Arthrobacter, Bacillus, Citrobacter, Gluconobacter* и *Rhodococcus* genera. The research results can be applied in the development of the technosphere remediation methods.

Keywords: PCR, tetracycline, gene *tetC*, bacteria, technogenic ecotope.

Поступила в редакцию: 22.11.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-559-563

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в ряде исследований была обнаружена растущая частота встречаемости устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. При этом отмечена тенденция накопления резистентных культур в сообществах, подвергающихся давлению синтетических производных, в том числе, попадающих в окружающую среду в ходе промышленного производства.

К серьезным последствиям увеличения в микробных популяциях резистентности к антибиотикам относят снижение эффективности борьбы с инфекциями в различных областях медицины, ветеринарии и сельского хозяйства. Тревожная тенденция роста устойчивости к противомикробным препаратам, прогнозируемая на предстоящие десятилетия, обуславливает высокую актуальность мониторинга резистома различных экосистем, включая техногенные.

Целью настоящей работы является выявление детерминирующего резистентность к тетрациклину гена *tet*C у штаммов техногенной экосистемы нефтехимического производства Республики Башкортостан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись бактерии семейств *Alcaligenaceae Micrococcaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Nocardiaceae,* выделенные из образцов почв и грунтов экотопов Уфимского промузла. Определение основных физиолого - биохимических признаков и классификация штаммов были осуществлены ранее. В ходе этих работ чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определялась диско-диффузионным методом [Жарикова и др., 2011, 2018; Журенко и др., 2003, 2012; Коробов и др., 2013, 2017; Маркушева и др.,1993, 1997; Федорова и др., 2011].

При проведении ПЦР применяли пары олигонуклеотидных праймеров к последовательности гена *tet*C, детерминирующего резистентность бактерий к тетрациклину (табл. 1). Синтез праймеров осуществлен компанией «Евроген» (г. Москва).

Таблица 1. Характеристика праймеров для идентификации гена *tetC*

ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ 5’ – 3’	РАЗМЕР ПРОДУКТА РЕАКЦИИ
tetC-F	5'- ACTTGGAGCCACTATCGAC-3'	881 п.н.
tetC-R	5'- CTACAATCCATGCCAACCC-3'	

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, включающей 2 мкл 10х Taq буфера с KCl (Thermo Scientiific), 2 мкл dNTP (2 мМ) (Thermo Scientiific), 1,1 мкл 25 мМ $MgCl_2$ (Thermo Scientiific), по 1 мкл 10 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,5 ед. Taq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия), 2 мкл – ДНК-матрицы. В качестве матрицы использовали препараты лизатов бактериальных клеток. Конечный объем реакции доводили деионизированной водой до 20 мкл. Для положительного контроля применяли штамм *E. coli* К-12, обладающий плазмидой pBR325, несущей гены *tet*C.

Процесс амплификации проводили на термоциклере ТС 2720 (Applied biosystems, США). Условия накопления ПЦР-продуктов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Режим ПЦР для амплификации гена *tetC*

СТАДИЯ	ТЕМПЕРАТУРА ИНКУБАЦИИ	ВРЕМЯ	КОЛИЧЕСТВО ЦИКЛОВ
Предварительная денатурация	94 °С	5 мин.	1
Денатурация	94 °С	30 с.	30
Отжиг	54 °С	30 с.	
Элонгация	72 °С	1 мин.	
Финальная элонгация	72 °С	10 мин	1

По завершении полимеразной цепной реакции образцы смешивали с раствором 0,025% бромфенолового синего и 0,025% ксиленцианола в 5% глицерине, после чего ДНК фракционировали с помощью горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле при напряжении электрического поля 6 В/см.

Визуализацию ДНК-амплификатов осуществляли после инкубации агарозного геля в растворе бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Результаты фракционирования фрагментов ДНК протоколировали в проходящем ультрафиолетовом спектре при 280 нм.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что техногенные экосистемы являются местами быстрого развития микробных сообществ, вступающих в сложные отношения с факторами трансформированной среды, среди которых существенное место занимают антибиотики группы тетрациклинов, обладающих активностью против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, хламидий, микоплазм, риккетсий, спирохет и некоторых простейших [Almakki et al., 2019].

К тетрациклинам относят родственные по химическому строению, антимикробному спектру и механизму действия природные и полусинтетические производные: тетрациклин, тетрациклина гидрохлорид, окситетрациклина гидрохлорид, морфоциклин, вибромицин и др.

В настоящее время в составе хромосом, плазмид и транспозонов микроорганизмов идентифицировано более 46 генов, детерминирующих устойчивость к тетрациклину, доксициклину, окситетрациклину и хлортетрациклину. Мобильная природа *tet* генов частично объясняет их широкое распространение среди многих видов бактерий [Roberts et al, 2016; Xiong et al., 2018].

Ген *tet*C, кодирующий резистентность к тетрациклину, был идентифицирован на транспозоне Tn*10* [Braus et al., 1984], а его нуклеотидная последовательность была опубликована в статье K. Schollmeier и соавторами [Schollmeier et al., 1984].

В настоящей работе поводилась ПЦР-детекция гена *tetC* в геномах штаммов бактерий *Achromobacter xylosoxidans* 36P, *Agromyces sp.* IBRB-34DCP, *Arthrobacter globiformis* IBRB-17S, *Bacillus cereus* 33T, *Bacillus subtilis* 16, *Citrobacter* sp. 36-4CPA,

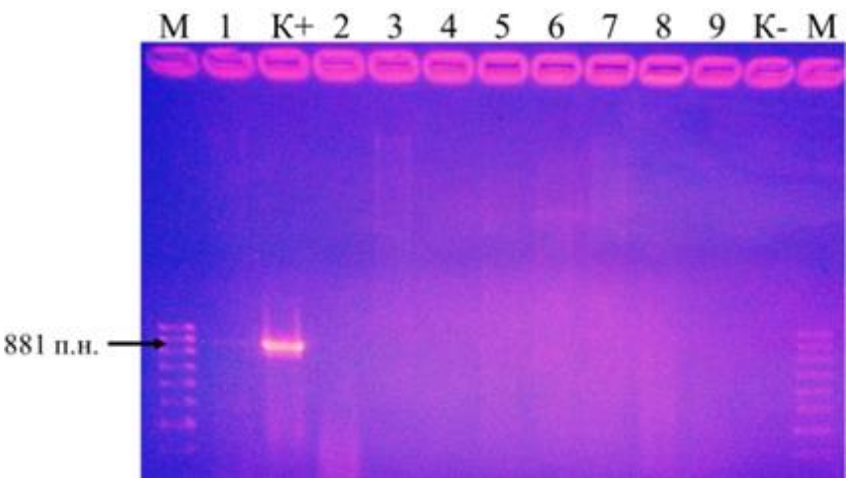

Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных при использовании специфичных к гену *tetC* праймеров. Условные обозначения препаратов : М — маркер молекулярного веса; К+ – положительный контроль; К- – отрицательный контроль; 1 – контроль; 2 – *Bacillus subtilis* 16; 3 – *Bacillus cereus* 33T; 4 – *Citrobacter* sp. 36-4CPA; 5 – *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T; 6 – *Rhodococcus erythropolis* 17S; 7 – *Achromobacter xylosoxidans* 36P; 8 – *Arthrobacter globiformis* IBRB-17S; 9 – *Agromyces sp.* IBRB-34DCP. Стрелкой указан целевой амплификат.

Gluconobacter oxydans IBRB-2T и *Rhodococcus erythropolis* 17S, выделенных из смешанных популяций микроорганизмов техногенных экотопов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства.

В качестве положительного контроля был использован штамм *E. coli* K-12, несущий плазмиду pBR325, последовательность с 86 п.н. по 1273 п.н. которой занимает ген *tetC*.

На рис.1. приведена электрофореграмма продуктов амплификации, полученных при использовании праймеров, специфичных для гена t*etC*.

Из рис.1 следует, что в ходе ПЦР в исследуемых образцах бактериальной ДНК не происходило накопление целевых амплификатов с ожидаемым размером 881 п.н.

Приведенное означает, что в геномах *Achromobacter xylosoxidans* 36P, *Agromyces sp.* IBRB-34DCP, *Arthrobacter globiformis* IBRB-17S, *Bacillus cereus* 33T, *Bacillus subtilis* 16, *Citrobacter* sp. 36-4CPA, *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T и *Rhodococcus erythropolis* 17S отсутствуют последовательности, подобные последовательности гена *tetC*

Установленные данные позволяют сделать заключение в пользу того, что механизмы резистентности к тетрациклину у штаммов почв и грунтов техногенных экотопов Уфимского промузла родов *Achromobacter, Agromyces, Arthrobacter, Bacillus, Citrobacter, Gluconobacter* и *Rhodococcus* могут быть обусловлены иными генетическими детерминантами.

Полученные в данном исследовании сведения согласуются с данными NCBI, согласно которым ранее обладающие геном *tetC* штаммы не обнаруживались среди представителей родов *Achromobacter, Agromyces, Arthrobacter, Gluconobacter* и *Rhodococcus.* Вместе с тем были выделены несущие ген *tetC* представители родов *Bacillus* и *Citrobacter.*

Результаты работы могут быть применены в разработках методов биологической ремедиации окружающей среды в техносфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Султанбекова М.Н., Каткова Е.Г., Кусова И.В., Чураев Р.Н. Штамм бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, осуществляющий деградацию фенола // Патент на изобретение RUS 2077575 17.09.1993.

3. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В. Ремедиация среды от хлорароматических гербицидов культурой *Arthrobacter globiformis* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013. № 2 (40). С. 218-219.
4. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В., Чураев Р.Н. *Bacillus cereus* ВКПМ В-7164, осуществляющий биологическую деградацию 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Патент на изобретение RUS 2129605 31.07.1997.
5. 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.
6. 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. Т. 25. № 4. С. 660-671.
7. Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Биотехнология. 2003. № 6. С. 67-71.
8. 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.
9. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17S, для очистки промышленных стоков // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 4. С. 235-240.
10. 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.
11. Roberts M.C., Schwarz S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment and humans // J. Environ. Qual. 2016. V. 45 (2). P. 576-592.
12. Xiong W., Wang M., Dai J., Sun Y., Zeng Z. Application of manure containing tetracyclines slowed down the dissipation of tet resistance genes and caused changes in the composition of soil bacteria // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 147. P. 455-460.
13. Braus G., Argast M., Beck C. F. Identification of Additional Genes on Transposon Tn *10*: *tet*C and *tet*D // J. Bacteriology. 1984. Vol. 160. No. 2. P. 504-509.
14. Schollmeier K., Hillen W. Transposon Tn *10* contains two structural genes with opposite polarity between tetA and IS 10_R // J. Bacteriol. 1984. Vol. 160. P.499-503.
15. Almakki A., Jumas-Bilak E., Marchandin H., Licznar-Fajardo P. Antibiotic resistance in urban runoff // Science of The Total Environment. 2019. V. 667. P. 64-76.