

УДК 579.25

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПОДДЕРЖАНИЯ КУЛЬТУР В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ И ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛИМИНИРУЮЩИХ АГЕНТОВ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Будагова Татьяна Юрьевна
студент
e-mail: 3780358.tanechka@gmail.com

Бардак Мария Владимировна
студент

Самков Андрей Александрович
SPIN-код: 5056-2186, к.б.н.

Худокормов Александр Александрович
SPIN-код:1081-9535, к.б.н.

Волченко Никита Николаевич
SPIN-код:4362-0193, к.б.н.
*Кубанский государственный университет,
Краснодар, Россия*

Штаммы, выделенные из природной среды, обладали меньшей устойчивостью к антибиотикам, нежели лабораторные коллекционные штаммы. Максимальную устойчивость микроорганизмы проявили к ампициллину. После воздействия бромистым этидием средняя процентная доля выявленных случаев антибиотикорезистентности отдельных штаммов к отдельным антибиотикам, по меньшей мере к одной из их концентраций, снизилась, для выделенных из открытого природного водоема штаммов на 43, для лабораторных штаммов – на 10 процентов. При обработке акридиновым оранжевым аналогичного изменения показателя у лабораторных штаммов не наблюдалось вообще, а для бактериальных штаммов, выделенных из водоема снижение составило 5 процентов

Ключевые слова: ЭНТЕРОБАКТЕРИИ, АКРИДИНОВЫЙ ОРАНЖЕВЫЙ, БРОМИСТЫЙ ЭТИДИЙ, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ЭЛИМИНАЦИЯ, ЭЛИМИНИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-181-004>

UDC 579.25

06.02.02 – Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences)

INFLUENCE OF THE DURATION OF MAINTENANCE OF CULTURES IN THE LABORATORY AND THE IMPACT OF ELIMINATING AGENTS ON THE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROBACTERIA

Budagova Tatiana Yurievna
student
e-mail: 3780358.tanechka@gmail.com

Bardak Maria Vladimirovna
student

Samkov Andrey Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., RSCI SPIN-code: 5056-2186

Khudokormov Aleksandr Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., RSCI SPIN-code:1081-9535

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci., RSCI SPIN-code:4362-0193
Kuban state university, Krasnodar, Russia

Strains isolated from the natural environment were less resistant to antibiotics than laboratory strains. Microorganisms showed maximum resistance to ampicillin. After exposure to ethidium bromide the percentage of identified antibiotic-resistant strains to antibiotics, at least to one of their concentrations, decreased. The percentage for strains isolated from a natural reservoir decreased by 43 percent, for laboratory strains by 10 percent. After treatment of laboratory strains with acridine orange a similar change in the average percentage was not observed at all, the percentage for strains isolated from a natural reservoir decreased by 5 percent

Keywords: ENTEROBACTERIA, ACRIDINE ORANGE, ETHIDIUM BROMIDE, ANTIBIOTIC RESISTANCE, ELIMINATION, ELIMINATION AGENTS

Одна из глобальных и актуальных проблем современного мира заключается в приобретении устойчивости к антибиотикам бактерий

<http://ej.kubagro.ru/2022/07/pdf/04.pdf>

разных групп по причине нерационального использования антибиотиков в лечебных целях, в сельском хозяйстве(6), а также в связи с неконтролируемым сбросом отходов, содержащих антибиотики в своем составе (5). Особенную опасность представляют бактерии, обладающие устойчивостью одновременно к нескольким антибиотикам, и бактерии, устойчивые к антибиотикам широкого спектра действия (4, 6). Своевременная оценка исходной антибиотикочувствительности штаммов, выделенных из природной среды, а также поиск эффективных методов снижения их устойчивости к антибиотикам может позволить избежать широкого распространения антибиотикорезистентности микроорганизмов (5), так как попадание в окружающую среду антибиотиков вызывает накопление бактериальных генов устойчивости в микробиоценозах (2).

Известно, что гены устойчивости к антибиотикам в бактериальной клетке могут быть локализованы как в плазмидной, так и в хромосомной ДНК, то есть антибиотикоустойчивость может развиваться либо в результате хромосомных мутаций, либо в результате обмена генетической информацией между бактериями (4). Одним из способов ограничения распространения резистентности к антибиотикам является использование элиминирующих плазмиды агентов, однако их использование ограничено ввиду опасности для высших организмов (1). Поэтому интерес может представлять потенциальное объединение и комбинирование отходов, в том числе стоков, содержащих антибиотики, с отходами, содержащими элиминирующие агенты (3, 4).

Цель работы заключается в сравнении антибиотикорезистентности штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из открытого природного водоема на территории города Краснодара, и штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, длительно поддерживаемых в лабораторных условиях, а также в анализе эффективности элиминации R-плазмид из

резистентных к антибиотикам бактериальных клеток в случае использования акридинового оранжевого и бромистого этидия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись выборки из семи лабораторных коллекционных штаммов, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*, и девяти штаммов *Enterobacteriaceae*, выделенных из открытого природного водоема, расположенного на территории города Краснодар.

Из открытого природного водоема был выделен ряд чистых бактериальных культур на среде Эндо. После был проведен анализ отобранных культур по физиолого-биохимическим, морфологическим и культуральным признакам с использованием стандартных сред: висмут-сульфитный агар, среда Эйкмана, среда Симмонса, - для точного их определения к семейству *Enterobacteriaceae*.

После была определена исходная устойчивость всех бактериальных штаммов к 5 антибиотикам: рифампицину, канамицину, эритромицину, ампициллину и стрептомицину. Исходная устойчивость определялась при помощи диффузионного метода дисков (7), а также на питательной среде Эндо с добавлением разных концентраций перечисленных антибиотиков (8): 25 мг/л, 100 мг/л, 400 мг/л. Посев проводили микробиологической репликой из бульонных культур.

Затем все исследуемые культуры инкубировали сутки в мясо-пептоном бульоне при 37°C с добавлением сублетальной концентрации 0,1 % элиминирующего агента – акридинового оранжевого или бромистого этидия (9, 10). После этого было проведено повторное оценивание антибиотикорезистентности всех бактериальных штаммов на питательной среде Эндо с добавлением тех же антибиотиков в тех же концентрациях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен сравнительный анализ исходной устойчивости к антибиотикам между лабораторными коллекционными бактериальными штаммами и штаммами, которые были выделены из открытого природного водоема. Данные приведены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1 – Антибиотикорезистентность штаммов, выделенных из открытого природного водоема: + (штамм устойчив к данной концентрации антибиотика), - (штамм не устойчив к данной концентрации антибиотика)

Антибиотик	Концентрация, мг/л	Штамм								
		6х	5х	9	4х	3	2х	1х	5	7х
Рифампицин	25	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	-	+	-	-	+	+	+	+
	400	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Канамицин	25	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Эритромицин	25	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	100	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	400	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ампициллин	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Стрептомицин	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	400	-	-	-	+	-	+	-	+	+

Таблица 2 – Антибиотикорезистентность лабораторных коллекционных штаммов: + (штамм устойчив к данной концентрации антибиотика), - (штамм не устойчив к данной концентрации антибиотика)

Антибиотик	Концентрация, мг/л	Штамм						
		ColBR-3	R27	R930	Rif100	C600	NaNa blue	DH-10
Рифампицин	25	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+
Канамицин	25	+	-	-	+	+	-	+
	100	-	-	-	-	+	-	-
	400	-	-	-	-	+	-	-
Эритромицин	25	+	+	+	+	+	+	-
	100	+	+	+	+	+	+	-
	400	-	-	-	+	-	+	-
Ампициллин	25	+	+	+	+	+	+	-
	100	+	+	+	+	+	+	-
	400	-	+	+	+	-	+	-
Стрептомицин	25	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	-	+
	400	+	-	+	-	+	-	+

Установлено, что штаммы, выделенные из природной среды, в среднем обладали меньшей устойчивостью к антибиотикам, нежели лабораторные коллекционные штаммы. Исходя из данных рисунка 1 была

высчитана средняя процентная доля бактериальных штаммов, исходно устойчивых, по меньшей мере, к одному из перечисленных антибиотиков в концентрации 400 мг/л. Она составила 80 процентов у лабораторных культур и 65 процентов у штаммов, выделенных из открытого природного водоема.

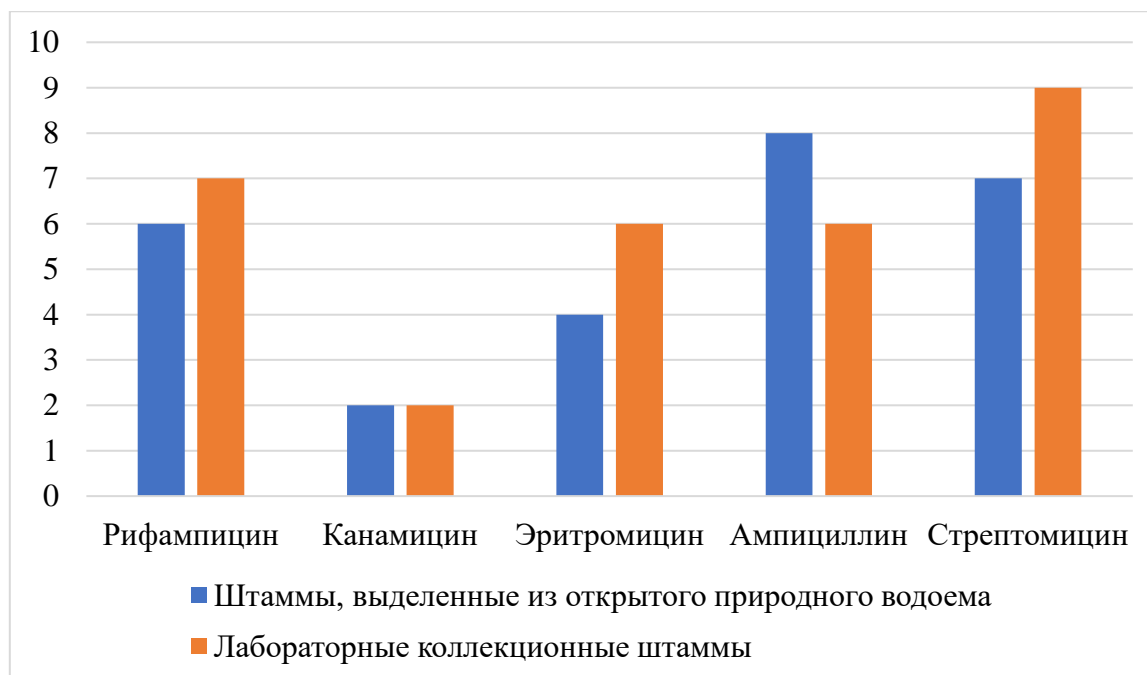


Рисунок 1 – Количество штаммов, проявивших устойчивость к любой из использованных концентраций антибиотика

Максимальную устойчивость микроорганизмы проявили к ампициллину – доля составила 95 процентов и 92 процента для вновь выделенных и длительно поддерживаемых лабораторных штаммов соответственно. Было обнаружено значительное превышение доли устойчивых лабораторных штаммов для таких антибиотиков, как рифампицин, эритромицин и стрептомицин (на 43 %, 29 % и 18 % соответственно) по сравнению с вновь выделенными. Процентное соотношение резистентных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* для вновь выделенных штаммов было распределено следующим образом: стрептомицин – 61 процент, эритромицин – 50 процентов, рифампицин – 50 процентов, канамицин – 28 процентов.

Бульонные культуры исследуемых штаммов подвергли воздействию различных элиминирующих агентов: акридиновым оранжевым и бромистым этидием. Из числа устойчивых бактериальных штаммов были определены средние процентные доли штаммов, потерявших антибиотикорезистентность после обработки одним из использованных элиминирующих агентов. После обработки штаммов бромистым этидием средняя процентная доля выявленных случаев антибиотикорезистентности отдельных штаммов к отдельным антибиотикам, по меньшей мере к одной из их концентраций, снизилась для штаммов, выделенных из природного водоема, на 43 процента, для лабораторных коллекционных штаммов – на 10 процентов (рисунок 2). В то время как при обработке штаммов акридиновым оранжевым аналогичного изменения показателя у лабораторных штаммов не наблюдалось вообще, а для бактериальных штаммов, выделенных из природного водоема, снижение показателя составило 5 процентов (рисунок 3).



Рисунок 2 – Усредненные доли штаммов, проявивших устойчивость к любой из использованных концентраций антибиотика, в зависимости от срока их хранения, до и после воздействия на них бромистым этидием



Рисунок 3 – Усредненные доли штаммов, проявивших устойчивость к любой из использованных концентраций антибиотика, в зависимости от срока их хранения, до и после воздействия на них акридиновым оранжевым

Добавление бромистого этидия наиболее выражено увеличило долю чувствительных штаммов к рифампицину и канамицину, что может свидетельствовать о локализации генов устойчивости к данным антибиотикам в плазмидной ДНК (11–13). Таким образом, более эффективным элиминирующим агентом в сравнении с акридиновым оранжевым оказался бромистый этидий (рисунок 4). При его добавлении к бактериальным культурам наблюдалось снижение доли штаммов, проявивших устойчивость, по меньшей мере, к одной из использованных концентраций антибиотика, на 10 процентов у лабораторных коллекционных штаммов и на 43 процента у штаммов, выделенных из открытого природного водоема. В то же время при добавлении акридинового оранжевого к бактериальным культурам снижение данного

показателя наблюдалось только у штаммов, выделенных из открытого природного водоема: на 5 процентов. При этом коллекционные лабораторные штаммы практически не потеряли свою устойчивость.

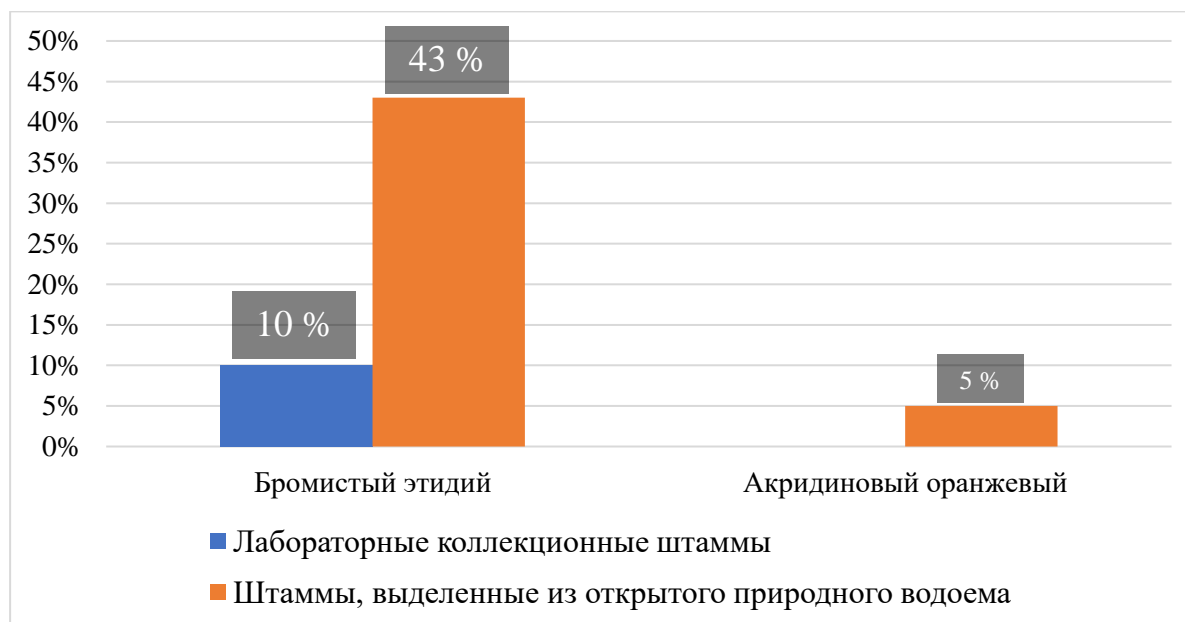


Рисунок 4 – Эффективность действия элиминирующих агентов, выраженная в процентах

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были обнаружены различия в резистентности к антибиотикам двух различных выборок штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, значительно отличающихся по продолжительности поддержания в лабораторных условиях: непосредственно выделенных из открытого природного водоема, а также длительно поддерживаемых в лабораторных условиях. Сравнительная оценка антибиотикорезистентности обеих групп показала, что коллекционные лабораторные штаммы являются более устойчивыми к антибиотикам, нежели штаммы, выделенные из открытого природного водоема. У микроорганизмов, выделенных из природной среды, наблюдалась повышенная устойчивость к ампициллину, а также было отмечено превышение доли резистентных штаммов к канамицину, вследствие чего

можно предположить о широком распространении генов устойчивости микроорганизмов к данным антибиотикам в исследуемом водоеме.

Также было выяснено, что к лучшему подавлению антибиотикорезистентности, как у коллекционных лабораторных штаммов, так и у штаммов, выделенных из открытого природного водоема, в сравнении с акридиновым оранжевым, привел бромистый этидий. Более эффективно бромистый этидий подействовал на угнетение антибиотикоустойчивости у штаммов, выделенных из водоема.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Amabile–Cuevas C. F., Heinemann A. J. Shooting the messenger of antibiotic resistance: Plasmid elimination as a potential counter-evolutionary tactic // *Drug Discovery Today*. – 2004. – Vol. 9. – P. 465–467.
2. Tan Y.–T. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria // *Molecular Medicine Today*. – 2000. – Vol. 6. – P. 309–314.
3. Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review / Zhang R. [et al.] // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 806. – P. 150647.
4. Hutinel M., Larsson D. G. J., Flach C–F. Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 812. – P. 151433.
5. Johannes A., Hembach N., Schwartz T. Identification of critical control points for antibiotic resistance discharge in sewers // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 820. – P. 153186.
6. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance / Mann A. [et al.] // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2. – P. 100030.
7. Page S., Raoult D., Rolain J–M. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2. – P. 100030.
8. Козлова Н. С., Баранцевич Н. Е., Баранцевич Е. П. Чувствительность к антибиотикам эшерихий, выделенных в многопрофильном стационаре // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2016. – № 4. – С. 83–88.
9. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids / Imre A. [et al.] // *Plasmid*. – 2006. – Vol. 55, № 3. – P. 235–241.
10. Mesas J. M., Rodriguez M. C., Alegre M. T. Plasmid curing of *Oenococcus oeni* // *Plasmid*. – 2004. – Vol. 51, №1. – P. 37–40.
11. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology / Szczepanowski R. [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 136, № 1–2. – P. 54–64.
12. Shabana I. I., Al–Enazi A. T. Investigation of plasmid-mediated resistance in *E. coli* isolated from healthy and diarrheic sheep and goats // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 27, № 3. – P. 788–796.

13. Monzon–Moreno C. Plasmid mediated resistance to trimethoprim in Enterobacteriaceae isolated in Gran Canaria, Canary Islands (Spain) Plasmides de resistance au trimethoprime (Tp) chez les Enterobacteries isolees a Grande Canarie, Iles Canaries (Espagne). – 1994. – Vol. 24, № 12. – P. 1248–1252.

REFERENCES

1. Amabile–Cuevas S. F., Heinemann A. J. Shooting the messenger of antibiotic resistance: Plasmid elimination as a potential counter-evolutionary tactic // *Drug Discovery Today*. – 2004. – Vol. 9. – P. 465–467.

2. Tan Y.–T. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria // *Molecular Medicine Today*. – 2000. – Vol. 6. – P. 309–314.

3. Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review / Zhang R. [et al.] // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 806. – P. 150647.

4. Hutinel M., Larsson D. G. J., Flach C–F. Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 812. – P. 151433.

5. Johannes A., Hembach N., Schwartz T. Identification of critical control points for antibiotic resistance discharge in sewers // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 820. – P. 153186.

6. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance / Mann A. [et al.] // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2. – P. 100030.

7. Page S., Raoult D., Rolain J–M. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2. – P. 100030.

8. Kozlova N. S., Barancevich N. E., Barancevich E. P. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam jesherihij, vydelennyh v mnogoprofil'nom stacionare // *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej*. – 2016. – № 4. – S. 83–88.

9. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids / Imre A. [et al.] // *Plasmid*. – 2006. – Vol. 55, № 3. – P. 235–241.

10. Mesas J. M., Rodriguez M. C., Alegre M. T. Plasmid curing of *Oenococcus oeni* // *Plasmid*. – 2004. – Vol. 51, №1. – P. 37–40.

11. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology / Szczepanowski R. [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 136, № 1–2. – P. 54–64.

12. Shabana I. I., Al–Enazi A. T. Investigation of plasmid-mediated resistance in *E. coli* isolated from healthy and diarrheic sheep and goats // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 27, № 3. – P. 788–796.

13. Monzon–Moreno C. Plasmid mediated resistance to trimethoprim in Enterobacteriaceae isolated in Gran Canaria, Canary Islands (Spain) Plasmides de resistance au trimethoprime (Tp) chez les Enterobacteries isolees a Grande Canarie, Iles Canaries (Espagne). – 1994. – Vol. 24, № 12. – P. 1248–1252.