

## ИЗУЧЕНИЕ БАЗОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ

© 2019 г. А. Г. Кудинова<sup>а</sup>, В. С. Соина<sup>б</sup>, С. А. Максакова<sup>б</sup>, М. А. Петрова<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182 Россия

<sup>б</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: petrova@img.ras.ru

Поступила в редакцию 05.04.2019 г.

После доработки 06.05.2019 г.

Принята к публикации 29.05.2019 г.

Почва является как местом обитания антибиотикорезистентных микроорганизмов и естественным источником генов устойчивости к антибиотикам, так и природной средой, в которой могут накапливаться и переноситься клинические детерминанты антибиотикоустойчивости. В этой связи актуальной является необходимость количественной оценки антибиотикоустойчивых бактерий в загрязненных почвах, используемых в сельском хозяйстве, по сравнению с так называемым фоновым содержанием в почвах устойчивых бактерий и генов антибиотикорезистентности. Однако данные по исследованию бактерий, устойчивых к антибиотикам в “чистых”, со сниженной антропогенной нагрузкой, почвах, практически отсутствуют. В настоящей работе проведено сравнительное исследование спектров устойчивости к природным и синтетическим антибиотикам у штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из почв как “чистых” экосистем (почвы Арктики и Антарктиды), так и мест с возможным загрязнением (дерново-подзолистой почвы Подмосковья), а также умеренно антропогенно загрязненные почвы с повышенным содержанием ртути вблизи Хайдарканского ртутного месторождения. Обнаружено, что во всех типах биотопов выявляются штаммы, обладающие устойчивостью к одному или более из использовавшихся природных антибиотиков, за исключением тетрациклина. Множественной лекарственной устойчивостью обладало около трети исследованных штаммов, выделенных как из “чистых” почв полярных областей с низкой антропогенной нагрузкой, так и из “загрязненных” почв вблизи Хайдарканского ртутного месторождения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие множественной устойчивости к антибиотикам у бактерий не является исключительно реакцией на антропогенные загрязнения. В “чистых” биотопах, формирующихся в экстремально холодных условиях, были выделены штаммы бактерий с широкими спектрами устойчивости к антибиотикам, в большинстве своем относящиеся к родам, среди представителей которых широко распространена врожденная антибиотикоустойчивость, обусловленная особенностями строения внешних клеточных покровов, препятствующих проникновению антибиотика в клетку, и наличием различных неспецифических эффлюкс-систем, обеспечивающих удаление из клетки токсичных для нее веществ.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, почвы Антарктиды, почвы Арктики, бактерии экстремально холодных биотопов, бактериальная устойчивость к ртути

**DOI:** 10.1134/S0026365619050094

Антибиотики (АБ) являются самым большим достижением фармацевтики двадцатого века, а возможно, и всей истории медицины. Однако селективное давление, вызванное широким применением АБ в течение более шестидесяти лет, привело к беспрецедентному распространению устойчивых к ним патогенов в больницах и в биосфере в целом. Существенное снижение эффективности этих “чудо-препаратов” названо Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) одной из величайших угроз для здоровья человечества (Neumann et al., 2007). Ряд экспертов называют сложившуюся

ситуацию “постантибиотической эпохой” (Suttrup, 2013).

Подавляющее большинство как АБ, используемых в настоящее время для лечения инфекций, так и генов устойчивости к ним, приобретенных патогенами человека, имеют природное происхождение (из почв и водоемов). Работы последних лет свидетельствуют о том, что в естественных условиях функции АБ могут быть никак не связаны с выполнением роли “оружия”, которую они играют в клинических условиях. В природных сообществах АБ могут иметь функции не столько подавления конкурентов в борьбе за субстрат, но,

прежде всего, передачи межклеточных и внутриклеточных сигналов, обеспечивая тем самым формирование биопленок, развитие устойчивости к металлам и др. (Martínez, 2008; Булгакова и соавт., 2014). Регуляторная роль АБ предполагает наличие механизмов ограничения их количества в клетках как самих продуцентов, так и реципиентных клеток, являющихся членами того же сообщества. Таким механизмом является развитие генетических систем устойчивости к АБ. Поэтому почва не только считается естественным местообитанием антибиотикорезистентных микроорганизмов, но и источником генов устойчивости к АБ. Кроме того, в современных условиях “эры антибиотиков”, почва также играет роль среды, в которой могут накапливаться и переноситься клинические детерминанты устойчивости. Это связано с тем, что и АБ, и устойчивые к ним бактерии попадают в окружающую среду за счет использования в качестве удобрений активного ила городских очистительных сооружений и навоза животных, которым давали АБ, или вследствие загрязнения промышленными отходами, в том числе от фармацевтических производств. Выращенная на таких почвах сельхозпродукция бывает контаминирована устойчивыми к АБ бактериями, которые с пищей попадают в организм человека и животных, что существенно отражается на повсеместном распространении АБ-резистентных штаммов. Кроме того, и мобильные элементы, обеспечивающие быстрое распространение лекарственной устойчивости среди патогенов, могут попадать в клинику из таких загрязненных почв и других естественных субстратов (Ashbolt et al., 2013; Williams-Nguyen et al., 2015). По этой причине АБ в XXI веке рассматриваются в качестве поллютантов окружающей среды (Martínez, 2009).

В этой связи подчеркивается необходимость оценки загрязнения используемых в сельском хозяйстве почв бактериями, устойчивыми к АБ. Во всех странах активно ведутся исследования устойчивости к АБ у почвенных бактерий при внесении навоза или активного ила, а также при антропогенных загрязнениях, например, солями тяжелых металлов, четвертичными соединениями аммония и др. Однако изучение устойчивости к АБ бактерий, выделенных из незагрязненных почв, в которых сохраняется естественный уровень природных механизмов устойчивости, и детерминант устойчивости, не претерпевших изменений под влиянием антропогенной деятельности, носит эпизодический характер. Очевидно, что без данных о резистентности бактерий в почвах, характеризующихся минимальным антропогенным воздействием, невозможно оценить степень загрязнения почв. Поэтому в научном мире появляются призывы начать систематическое изучение содержания антибиотикоустойчивых бакте-

рий в экологически чистых почвах, а также структуры их детерминант устойчивости с целью получения данных по так называемому “базовому” (фоновому) содержанию устойчивых бактерий и генов антибиотикорезистентности в почвах (Durso et al., 2016; Rothrock et al., 2016; Van Goethem et al., 2018). Изучение бактерий из чистых экосистем, несомненно, может дать ответы на ряд вопросов, связанных с закономерностями распространения устойчивых микроорганизмов и генов устойчивости и для разработки мер по ограничению этого распространения. Высказываются предположения, что почвы с минимальным антропогенным загрязнением и, как следствие, минимальным селективным давлением поллютантов должны отражать только уровень и спектр природных АБ и детерминант резистентности к ним (D’Costa et al., 2011), и практически не содержать генов устойчивости к синтетическим и полусинтетическим АБ, использование которых было начато в XX веке (Martínez, 2009). В связи с этим, сравнительное исследование спектров устойчивости к АБ природных почвенных бактерий из чистых и загрязненных природных местообитаний является важнейшей задачей. Несмотря на очевидную практическую и научную значимость этой проблемы, работ, посвященных определению базовой природной устойчивости к АБ, очень немного, и они содержат противоречивую информацию. Так при исследовании бактерий, выделенных из вечной мерзлоты Арктики и Антарктики, было отмечено, что при прямом высеве образцов на среды с различными АБ менее  $10^{-3}$  от общего числа клеток были способны образовывать колонии. При этом было установлено, что у изолятов реже всего встречается устойчивость к тетрациклину (Миндлин и соавт., 2008). А при изучении антибиотикоустойчивости бактерий, выделенных из осадочных пород, изолированных от поверхности в течение 3 млн лет, обнаружено, что 90% изолятов обладают устойчивостью хотя бы к одному АБ и 86–62% – более чем к одному. При этом чаще всего наблюдалась устойчивость к налидиксовой кислоте, тетрациклину и мупироцину (Brown, Balkwill, 2009). Помимо этой информации, есть две работы, целью которых как раз и было определение фоновой антибиотикоустойчивости бактерий из степных почв Небраски (Durso et al., 2016) и тундровых почв Канады (Hayward et al., 2018). Хотя авторы пытались выбрать наиболее чистые места для отбора проб, обнаруженная ими высокая частота распространения детерминант устойчивости к тетрациклину и сульфаниламидам наводит на мысль о том, что их предположение о нетронутости исследуемых экосистем было неверным, что и послужило стимулом для проведения данного исследования.

**Таблица 1.** Места отбора образцов почв, использованных для выделения устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий

| Районы отбора образцов почв                                                                                                                                    | Описание почв                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Восточная Антарктида:<br>районы станций Молодежная и Прогресс (влажные долины оазисов Холмы Ларсеманн и Холмы Тала)                                            | Псаммоземы со слабо развитыми органогенными горизонтами W (верхние горизонты 5–10 и 15–20 см)                                                                                                                                                                    |
| Арктика:<br>о. Западный Шпицберген, архипелаг Шпицберген<br><br>о. Северный, архипелаг Новая Земля<br>о. Хейса, архипелаг Земля Франца-Иосифа<br>о. Земля Визе | Пелоземы типичные и глееватые, псаммоземы типичные (верхние горизонты 5–10 см)<br>Литозем грубогумусовый (верхние горизонты 5–10 см)<br>Псаммозем мерзлотный (верхние горизонты 0–10 см)<br>Слаборазвитые пустынно-арктические почвы (верхние горизонты 0–10 см) |
| Киргизия:<br><br>Хайдарканское месторождение ртутных руд                                                                                                       | Сероземы на карбонатной коре выветривания (верхний горизонт 0–5 см)                                                                                                                                                                                              |
| Московская область:<br>лесопарковая зона в 10 км от дачного поселка Загорянский                                                                                | Дерново-подзолистая почва (горизонт А1)                                                                                                                                                                                                                          |

Целью работы было сравнить спектр устойчивости к природным и синтетическим антибиотикам штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных как из экосистем, не затронутых антропогенной деятельностью (почв Арктики и Антарктиды), так и биотопов с возможным загрязнением (дерново-подзолистая почва Подмосковья) и почв с высоким содержанием ртути (вблизи Хайдарканского ртутного месторождения).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Объектами исследования были микробные сообщества, выделенные из образцов почв оазисов Восточной Антарктиды, Арктики, дерново-подзолистой почвы (горизонт А1) из лесопарковой зоны Подмосковья и сероземов (горизонт А) из района Хайдарканского ртутного месторождения (табл. 1).

Образцы почв Восточной Антарктиды отобраны сотрудниками Института географии РАН к. г. н. Н.С. Мергеловым и к. г. н. А.В. Долгих в период 56-ой и 58-ой Российских антарктических экспедиций в районе оазисов Холмы Ларсеманн и Холмы Тала. Образцы почв Арктики были отобраны в ходе комплексной экспедиции “Мониторинговые исследования среды обитания человека в полярных регионах” (переданы В.С. Крыленковым) на островах Земля Визе, Северный (Новая Земля) и Хейса (Земля Франца-Иосифа), а также на морене ледника Альегонда острова Западный Шпицберген (переданы

Н.С. Мергеловым). Образцы дерново-подзолистой почвы были получены с кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. Сероземы в районе Хайдарканского ртутного месторождения были отобраны чл.-корр. РАН Р.Б. Хесиным в мае 1983 г (Khesin, Karasyova, 1984).

**Использованные штаммы и условия культивирования.** В работе были использованы только изоляты грамотрицательных бактерий, поскольку для них легче стандартизовать процедуру тестирования устойчивости к АБ. Из образцов почв Восточной Антарктики нами были выделены 53 штамма, из тундровых арктических почв – 20, из дерново-подзолистых почв Подмосковья – 21 штамм, из почв района Хайдарканского ртутного месторождения – 33 штамма, формирующих, соответственно, 4 коллекции. Чтобы избежать изменений генотипа и биохимического статуса, которые могут происходить в ходе последовательных пересевов культур в лаборатории и, в частности, приводить к изменению антибиотикоустойчивости, все штаммы сразу после выделения в чистую культуру закладывали на длительное хранение. Штаммы из Антарктиды и Подмосковья были выделены в ходе работы и сразу же заложены на хранение под минеральное масло (Sambrook, Russell, 2001). Штаммы из Арктики и Хайдаркана были ранее выделены в ИМГ РАН и сразу после выделения лиофилизированы. Для культивирования изолятов использовали бульон Лурия-Бертани (LB) (Sambrook, Russel, 2001), а также LB с добавлени-

**Таблица 2.** Штаммы из коллекции ИМГ РАН, использованные в качестве контролей в опытах по определению спектра устойчивости

| Название штамма                                 | Спектр устойчивости*                     | Ссылка               |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|
| Отрицательный контроль                          |                                          |                      |
| JF 238 ( <i>E. coli</i> )                       | Чувствительный ко всем использованным АБ | Petrova et al., 2011 |
| Положительные контроли                          |                                          |                      |
| JF238 ( <i>E. coli</i> ) (pGEM-7Zf (-)::Tn5045) | Ap, Str, Sp, Nal                         | Petrova et al., 2011 |
| VS15 ( <i>Acinetobacter lwoffii</i> )           | Ap, Lv, Str, Sp                          | Mindlin et al., 2009 |
| MR29-12 ( <i>Psychrobacter maritimus</i> )      | Ap, Str, Tc                              | Mindlin et al., 2009 |
| TC79 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )    | Hg, Ap, Km                               | Petrova et al., 2014 |

\* Здесь и далее обозначения антибиотиков: Ap – ампициллин, Km – канамицин, Lv – левомицетин (хлорамфеникол), Nal – налидиксовая кислота, Str – стрептомицин, Sp – спектиномицин, Tc – тетрациклин, Hg – HgCl<sub>2</sub> (сулема).

ем 1.8% агара (LA). Все штаммы выращивали при 30°C.

**Определение спектра устойчивости.** Опыты по определению спектра устойчивости штаммов к различным АБ проводили с помощью матрицы на 50 лунок. В качестве положительных/отрицательных контролей в опытах по определению спектра устойчивости к АБ были использованы ранее охарактеризованные штаммы (табл. 2). Использовали только свежие (суточные) культуры. В каждую лунку матрицы вносили 100 мкл LB и с помощью стерильной зубочистки суспендировали один из тестируемых или контрольных штаммов. После заполнения всех лунок с помощью специального инокулятора матрицу последовательно печатали на чашки Петри со средой LA без АБ (для контроля роста каждого штамма) и с одним из антибиотиков различных классов в следующих концентрациях (мкг/мл): 1) аминогликозиды: стрептомицин (Str) – 50–100, канамицин (Km) – 25–50, спектиномицин (Sp) – 50–100; 2) тетрациклины: тетрациклин (Tc) – 10; 3) производные нитробензола: хлорамфеникол (левомицетин) (Cm) – 20; 4) β-лактамы: ампициллин (Ap) – 100–200; 5) хинолоны – налидиксовая кислота (Nal) – 20. Концентрации АБ были подобраны ранее экспериментальным путем как наиболее оптимальные для выявления бактерий, устойчивых к данным АБ (Petrova et al., 2009). Чашки инкубировали 1 сут при 30°C, после чего оценивали устойчивость каждого штамма по сравнению с отрицательным и положительными контролями и его ростом на среде без АБ. Вывод о спектре устойчивости штаммов к АБ делали на основании трех (и более при необходимости) независимых опытов. Устойчивость ряда штаммов была дополнительно проверена с помощью рассевов на чашках с АБ при сравнении с контрольными устойчивыми и чувствительными штаммами.

Штаммы из Хайдарканского ртутного месторождения дополнительно проверяли на устойчивость к ртути (HgCl<sub>2</sub>, 5 мкг/мл).

**Идентификация штаммов.** Выборочно до рода были идентифицированы по 1–3 штамма с каждым типом спектра антибиотикоустойчивости (табл. 3) из каждой коллекции. Идентификацию проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК штаммов. Генетическую ДНК из бактериальных клеток выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Scientific”), следуя рекомендациям производителя. Для амплификации гена 16S рНК использовали универсальные консервативные праймеры прокариот 63F и 1387R (Lane, 1991). ПЦР проводили в режиме: 1) 95°C – 4 мин, 2) 30 циклов с чередованием температурных интервалов: 95°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 30 с, 3) 72°C – 5 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 0.9% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. ПЦР-продукты очищали на колонках с помощью готового набора GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Scientific”). Секвенирование очищенных фрагментов ДНК проводили на автоматическом секвенаторе в ЦКП “Геном” (Институт молекулярной биологии РАН). Нуклеотидные последовательности генов 16S рНК анализировали с использованием программ онлайн программ BLAST (Altschul et al., 1990).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При обсуждении проблемы исследования фоновой (базовой) устойчивости к АБ в литературе дискутируется вопрос, где отбирать образцы для ее определения. Естественно, что наиболее оптимальными являются районы, для которых документально подтверждено отсутствие каких-либо загрязнений на протяжении хотя бы нескольких последних десятилетий. Однако чаще всего быва-

Таблица 3. Спектры устойчивости к антибиотикам в различных почвах

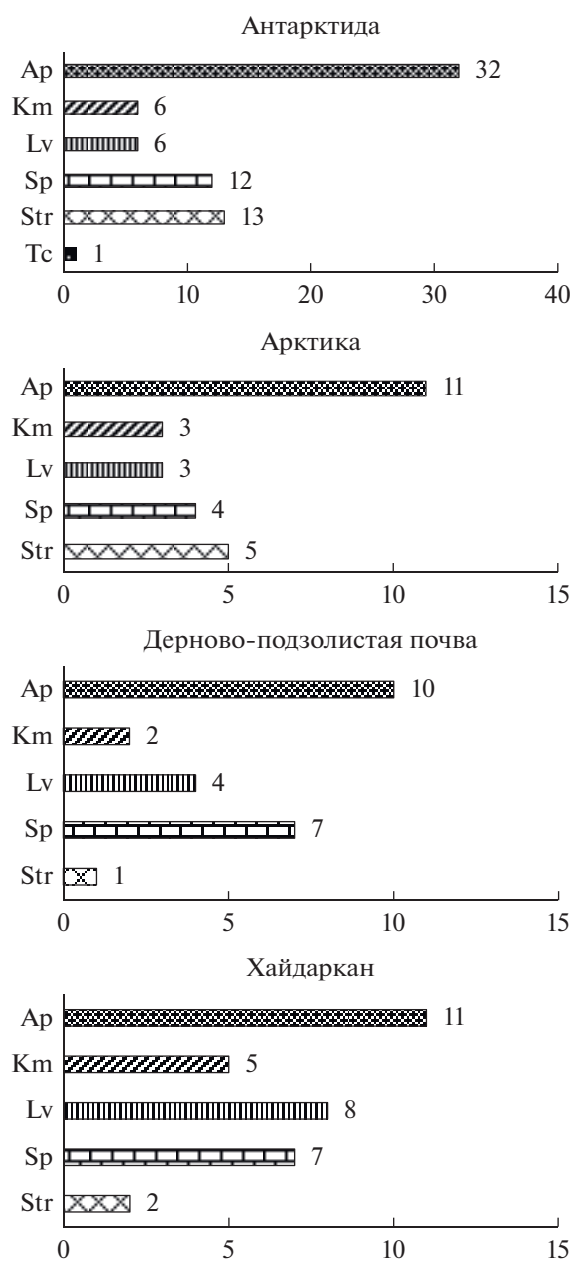
| Спектры устойчивости*  | Встречаемость разных спектров устойчивости к АБ** |                |                           |                |
|------------------------|---------------------------------------------------|----------------|---------------------------|----------------|
|                        | Арктика                                           | Антарктида     | дерново-подзолистая почва | Хайдаркан      |
| Str                    | 3–15.0                                            | 5–9.4          | –                         | 2–6.1          |
| Sp                     | –                                                 | 1–1.9          | 2–9.5                     | –              |
| Km                     | 1–5.0                                             | 2–3.8          | 2–9.5                     | 4–12.1         |
| Lv                     | –                                                 | –              | –                         | 3–9.1          |
| Ap                     | 5–25.0                                            | 17–32.1        | 4–19.1                    | 3–9.1          |
| <b>1 устойчивости</b>  | <b>9–45.0</b>                                     | <b>25–47.2</b> | <b>8–38.1</b>             | <b>12–36.4</b> |
| Ap, Lv                 | 3–15.0                                            | 4–7.5          | 1–4.75                    | –              |
| Ap, Sp                 | 1–5.0                                             | 2–3.8          | 1–4.75                    | 2–6.1          |
| Str, Sp                | 1–5.0                                             | –              | –                         | –              |
| Km, Lv                 | –                                                 | 1–1.9          | –                         | –              |
| Km, Ap                 | –                                                 | –              | –                         | 1–3.0          |
| <b>2 устойчивости</b>  | <b>5–25.0</b>                                     | <b>7–13.2</b>  | <b>2–9.5</b>              | <b>3–9.1</b>   |
| Ap, Lv, Sp             | –                                                 | 1–1.9          | 3–14.3                    | 5–15.1         |
| Ap, Sp, Str            | –                                                 | 5–9.4          | 1–4.75                    | –              |
| Ap, Sp, Km             | 1–5.0                                             | –              | –                         | –              |
| <b>3 устойчивости</b>  | <b>1–5.0</b>                                      | <b>6–11.3</b>  | <b>4–19.1</b>             | <b>5–15.1</b>  |
| Ap Sp Str Km           | 1–5.0                                             | 2–3.7          | –                         | –              |
| <b>4 устойчивости</b>  | <b>1–5.0</b>                                      | <b>2– .8</b>   | –                         | –              |
| Ap Sp Str Km Tc        | –                                                 | 1–1.9          | –                         | –              |
| <b>5 устойчивостей</b> | –                                                 | <b>1–1.9</b>   | –                         | –              |
| <b>Чувствительные</b>  | <b>4–20.0</b>                                     | <b>12–22.6</b> | <b>7–33.3</b>             | <b>13–39.4</b> |
| Всего штаммов          | <b>20</b>                                         | <b>53</b>      | <b>21</b>                 | <b>33</b>      |

\* Обозначения антибиотиков как в табл. 2.

\*\* Количество изолятов с данным спектром антибиотикоустойчивости в % от общего числа изолятов данной коллекции.

ет необходимо определять базовую устойчивость для районов, где почвы активно используются человеком, но в таких местах найти чистую почву для исследования нередко бывает невозможно. Поэтому очень трудно разграничить устойчивость, являющуюся результатом антропогенного воздействия, от колебаний природной резистентности, которая может зависеть от естественной неоднородности и пространственной динамики устойчивых к АБ бактерий в различных почвах (Durso et al., 2018). В настоящей работе были проведены сравнительные исследования спектров устойчивости к выбранным нами АБ и частоты распространения антибиотикоустойчивых штаммов почвенных бактерий, выделенных из незагрязненных мест, а также биотопов с небольшой антропогенной нагрузкой. Под небольшой антропогенной нагрузкой подразумевается невысокая посещаемость людьми и животными мест отбора проб и отсутствие явного промышленного и сельскохозяйственного загрязнения. Кроме того, были исследованы такие места, где помимо не-

большой антропогенной нагрузки наблюдается повышенное естественное содержание ртути. Такие биотопы были выбраны нами в связи с тем, что в клинике часто гены устойчивости к ртути и гены резистентности к различным АБ входят в состав одних и тех же мобильных элементов (R-плазмид и транспозонов группы Tn21). Кроме того, было показано, что в городских почвах увеличение содержания тяжелых металлов приводит к росту содержания генов устойчивости к различным АБ за счет горизонтального переноса мобильных элементов, содержащих оба типа детерминант резистентности (Zhao et al., 2019). Таким образом, при селективном давлении, вызванном повышенным содержанием ртути, могут одновременно отбираться бактерии, устойчивые как к ртути, так и к АБ. Мы ограничились исследованием только грамтрицательных бактерий, поскольку их рост обычно ингибируют сходные концентрации различных АБ, тогда как для грамположительных бактерий ингибирующие кон-



**Рис. 1.** Устойчивость выделенных штаммов к использованному АБ. Цифрами на диаграммах указано число резистентных штаммов к каждому из АБ в разных биотопах. Обозначения антибиотиков как в табл. 2.

центрации могут сильно варьировать, что затрудняет массовый анализ.

Во всех исследованных биотопах обнаружены штаммы, обладающие устойчивостью к одному или более из использовавшихся природных (то есть не синтетических) АБ, за исключением тетрациклина, устойчивости к которому проявил лишь один штамм из Антарктиды (рис. 1). Следует отметить, что в 98 из 100 исследованных образцов почв Небраски, которые рассматривали как

чистые, были обнаружены гены устойчивости к тетрациклину. Кроме того, ни один из исследованных нами штаммов не проявил устойчивости к налидиксовой кислоте, которая является синтетическим антибактериальным препаратом. Возможно, причиной этого является искусственное происхождение данного АБ, однако в ряде работ в относительно чистых почвах обнаруживали присутствие генов устойчивости к сульфаниламиду, который также является синтетическим препаратом (Durso et al., 2016; Hayward et al., 2018). У исследованных в данной работе штаммов бактерий наиболее распространена устойчивость к ампициллину. Далее по степени убывания встречаемости идут устойчивости к спектиномицину, левомицетину, стрептомицину и на последнем месте, как уже было сказано выше, к тетрациклину. Сходная закономерность была отмечена при исследовании спектров устойчивости к АБ грамотрицательных бактерий, выделенных из многолетнемерзлых отложений (Миндлин и соавт., 2008), и при анализе метагеномов антарктических почв, в которых было выявлено присутствие генов устойчивости к аминогликозидам, хлорамфениколу и бета-лактамам АБ (Van Goethem et al., 2018).

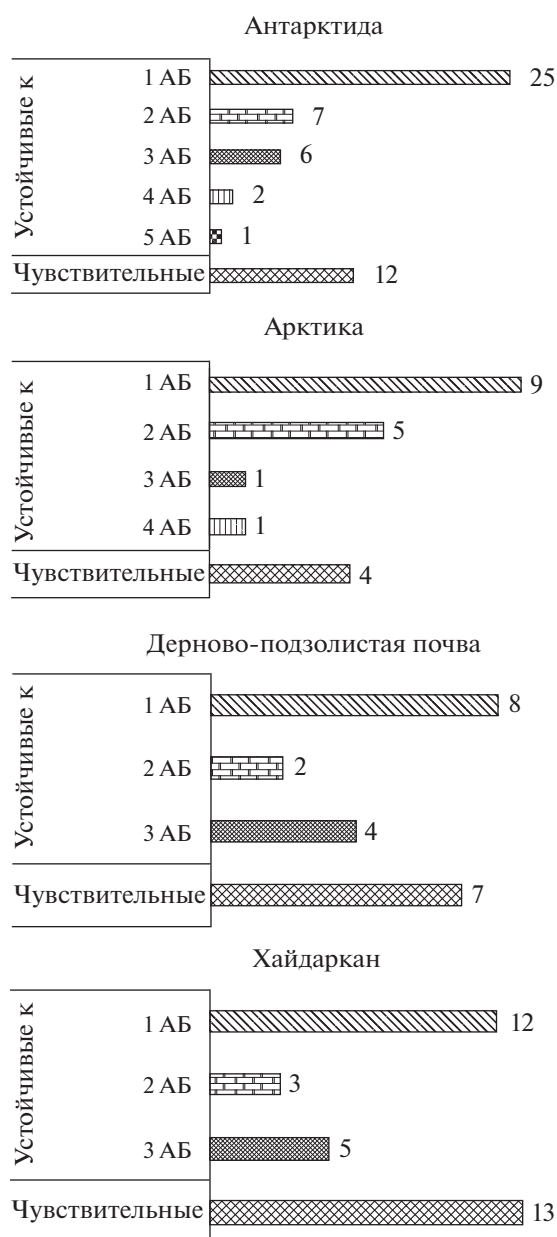
Во всех выборках около трети штаммов обладали устойчивостью к одному АБ, а чувствительные штаммы также составляли приблизительно треть от общего числа в почвах полярных областей и чуть больше в образцах дерново-подзолистой почвы и сероземов в районе Хайдарканского рудника (табл. 3). На диаграмме (рис. 2) видно, что штаммы из почв полярных областей обладали более широким спектром устойчивости, по сравнению со штаммами из дерново-подзолистых почв и сероземов. Причем в коллекции антарктических штаммов с устойчивостью к трем различным АБ было обнаружено больше штаммов, чем в коллекции из арктических почв. Таким образом, устойчивость к АБ штаммов бактерий, обитающих в нетронутых почвах, отличающихся суровыми климатическими условиями формирования, оказалась чуть выше, чем у штаммов, выделенных из почвы, подверженной слабому антропогенному воздействию, умеренной климатической зоны и почв вблизи ртутного рудника.

Интересен следующий факт. При том, что 29 из 33 хайдарканских штаммов были устойчивы к сулеме, наличие ртути в почве не привело к увеличению устойчивости к АБ обитающих в ней штаммов, в отличие от городских почв, в которых повышение содержания тяжелых металлов, и в частности ртути, приводило к увеличению количества копий и разнообразия генов устойчивости к АБ (Zhao et al., 2019). Из этого следует, что детерминанты устойчивости и генетические структуры, в состав которых они входят, в биотопах, подвергающихся сильному антропогенному воз-

действию или не подвергающихся таковому, могут сильно различаться. Косвенные данные о том, что в “чистых” природных популяциях, в отличие от популяций из “загрязненных” почв и клиники, гены устойчивости к АБ не сцеплены с мобильными элементами, были получены и при исследовании образцов почв Восточной Антарктиды (Van Goethem et al., 2018). В цикле работ по изучению молекулярно-генетической структуры детерминант устойчивости к АБ и ртути у бактерий из вечной мерзлоты было показано, что у них, в отличие от “клинических” детерминант, преобладают простые мобильные элементы, содержащие устойчивость только к одному АБ или ртути (Миндлин, Петрова, 2017).

Полученные данные свидетельствуют о том, что штаммы бактерий из чистых почв полярных областей обладают множественной устойчивостью к АБ, сходной с резистентностью изолятов из почв с низким антропогенным воздействием или с повышенным содержанием ртути. Таким образом, наличие множественной устойчивости к АБ не является исключительно реакцией на антропогенное загрязнение. Вероятно, в “чистых” биотопах, формирующихся в экстремально холодных условиях, устойчивость связана в большей степени с так называемой врожденной устойчивостью, которая обусловлена, например, характерным для конкретной систематической группы строением клеточной стенки, препятствующей проникновению АБ в клетку и/или наличием различных неспецифических систем выброса токсичных для клетки веществ.

Тот факт, что спектры устойчивости антарктических штаммов были шире спектров штаммов из Хайдаркана, может быть связан с тем, что штаммы из Антарктиды вообще могут проявлять высокую степень толерантности к различным стрессам в силу постоянного внешнего воздействия экстремальных условий: низкой влажности, высокого уровня УФ облучения, постоянных колебаний температуры. Наиболее вероятно, что в данном случае устойчивость к АБ не обусловлена наличием специфических генов устойчивости, а возникает за счет неспецифических механизмов, связанных с изменением протекания биохимических процессов в клетке в целом. Кроме того, можно предположить, что при наличии высоких концентраций ртути, которые характерны для Хайдарканского месторождения, отбираются бактерии тех систематических групп, которые не обладают врожденной устойчивостью к АБ. Следует подчеркнуть, что у клинических штаммов как раз устойчивость к ртути часто бывает сцеплена с множественной лекарственной устойчивостью, поскольку все детерминанты входят в состав одних и тех же мобильных элементов, обеспечивающих их распространение.



**Рис. 2.** Количество изолятов, обладающих разными спектрами устойчивости к АБ в коллекциях из разных биотопов. Цифрами около каждого из столбцов на диаграммах указано число изолятов, обладающих устойчивостью к одному, двум, трем или четырем АБ или чувствительных ко всем АБ.

Обращает на себя внимание тот факт, что среди штаммов с множественной устойчивостью были выявлены различные типы спектров устойчивости к АБ (табл. 3). Причем некоторые спектры устойчивости были обнаружены в разных биотопах. Например, комбинация устойчивости “Ар, Sp” встречалась у бактерий, выделенных из всех 4-х местообитаний; спектры устойчивости “Ар, Lv” и “Ар, Lv, Sp” — у бактерий из трех биотопов;

Таблица 4. Спектр устойчивости идентифицированных штаммов бактерий

| Спектр устойчивости* | Арктика                                       | Антарктида                                               | Дерново-подзолистая почва                                         | Хайдаркан                                         |
|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Str                  | <i>Acinetobacter</i> ,<br><i>Sphingomonas</i> | <i>Delftia</i> , <i>Ralstonia</i> ,<br><i>Variovorax</i> | —                                                                 | <i>Acinetobacter</i>                              |
| Sp                   | —                                             | <i>Sphingomonas</i>                                      | <i>Cytophaga</i> , <i>Bacteroides</i>                             | —                                                 |
| Km                   | <i>Chryseobacterium</i>                       | <i>Ochrobactrum</i>                                      | <i>Cytophaga</i> ,<br><i>Comamonas</i>                            | <i>Acinetobacter</i> (2)                          |
| Lv                   | —                                             | —                                                        | —                                                                 | <i>Acinetobacter</i>                              |
| Ap                   | <i>Pseudomonas</i> (2)                        | <i>Pseudomonas</i> (6),<br><i>Brevundimonas</i>          | <i>Pseudomonas</i> (2)                                            | <i>Pseudomonas</i> ,<br><i>Acinetobacter</i>      |
| Ap, Lv               | <i>Pseudomonas</i> (2)                        | <i>Pseudomonas</i> (2)                                   | <i>Pseudomonas</i>                                                | —                                                 |
| Ap, Sp               | <i>Pseudomonas</i>                            | <i>Pseudomonas</i>                                       | <i>Pseudomonas</i>                                                | <i>Pseudomonas</i> ,<br><i>Acinetobacter</i>      |
| Str, Sp              | <i>Acinetobacter</i>                          | —                                                        | —                                                                 | —                                                 |
| Km, Lv               | —                                             | <i>Ralstonia</i>                                         | —                                                                 | —                                                 |
| Km, Ap               | —                                             | —                                                        | —                                                                 | <i>Acinetobacter</i>                              |
| Ap, Lv, Sp           | —                                             | <i>Pseudomonas</i>                                       | <i>Pseudomonas</i> (2)                                            | <i>Pseudomonas</i> (2)                            |
| Ap, Sp, Str          | —                                             | <i>Pseudomonas</i> (2)                                   | <i>Delftia</i>                                                    | —                                                 |
| Ap, Sp, Km           | <i>Stenotrophomonas</i>                       | —                                                        | —                                                                 | —                                                 |
| Ap, Sp, Str, Km      | <i>Chryseobacterium</i>                       | <i>Variovorax</i>                                        | —                                                                 | —                                                 |
| Ap, Sp, Str, Km, Tc  | —                                             | <i>Acinetobacter</i>                                     | —                                                                 | —                                                 |
| Чувствительные       | Н.о.                                          | Н.о.                                                     | <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> ,<br><i>Agrobacterium</i> | <i>Acinetobacter</i> (2),<br><i>Psychrobacter</i> |

\* Обозначения антибиотиков как в табл. 2.  
Н.о. — не определяли.

спектр “Ap, Sp, Str” — у бактерий из образцов антарктических почв, дерново-подзолистой почвы, и образцов серозема в районе Хайдарканского ртутного месторождения; спектр “Ap, Sp, Str, Km” — у бактерий из арктических и антарктических почв. Можно предположить, что эти спектры принадлежат типичным почвенным бактериям, обитающим в разных почвах. Кроме того, были выявлены уникальные спектры устойчивости к нескольким АБ у бактерий, выделенных из разных почв, например, “Km, Lv” и “Ap, Sp, Str, Km, Tc”.

Для проверки гипотезы о зависимости спектра устойчивости от систематической принадлежности данного бактериального штамма мы провели выборочную идентификацию штаммов с каждым типом спектра устойчивости из каждой экосистемы. Из рассмотрения табл. 4 следует, что штаммы с широкими спектрами устойчивости преимущественно относятся к родам, среди представителей которых широко распространена врожденная устойчивость: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*. Причем псевдомонады преобладают среди изолятов с широкими спектрами. Известно, что псевдомонады за счет низкого содержания поринов в клеточной мембране обладают устойчивостью к ампициллину (Delcour, 2009),

что четко подтверждают и наши данные. Кроме того, псевдомонады обладают активными системами эффлюкса, что может обеспечивать устойчивость к АБ разных классов. Псевдомонады являются типичными обитателями различных почв, и именно к ним относятся штаммы с одинаковыми спектрами, обнаруженные во всех или в большинстве исследуемых биотопов. Системы эффлюкса имеются у многих граммотрицательных бактерий, чем, по-видимому, и обусловлена устойчивость штаммов, относящихся к таким родам, как *Sphingomonas*, *Delftia*, *Ralstonia*, *Variovorax*, *Cytophaga*, *Bacteroides*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*. Следует отметить, что среди устойчивых одновременно к нескольким различным антибиотикам штаммов граммотрицательных бактерий, выделенных из образцов многолетнемерзлых отложений, также преобладали представители *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* (Mindlin et al., 2009).

Интересно, что представители рода *Acinetobacter* были обнаружены как среди чувствительных штаммов, так и среди изолятов и с узким, и с широким спектром устойчивости. При этом клинические штаммы, относящиеся к этому роду, славятся своими широчайшими спектрами



устойчивости, часто также являющейся врожденной, по крайней мере, частично. Ряд почвенных псевдомонад также обладали весьма скромными спектрами устойчивости, по сравнению с клиническими штаммами. Эти факты еще раз свидетельствуют о том, что в клинике в условиях жесткого селективного отбора реализуются все потенциальные возможности, позволяющие бактериям выживать.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что бактерии из незагрязненных местообитаний могут обладать множественной устойчивостью к АБ. Изучение детерминант устойчивости к АБ бактерий, выделенных из почв, формирующихся в экстремальных климатических условиях практически в отсутствие антропогенного воздействия, позволит расширить представления о механизмах устойчивости природных штаммов к АБ и их эволюции. К аналогичному заключению пришли и авторы работы по исследованию разнообразия и структуры детерминант устойчивости к АБ в метагеномах нетронутых антарктических почв в районе ледника Маккай. Авторы предложили рассматривать антарктические почвы как “природный резервуар” генов устойчивости к АБ, сформировавшийся в отсутствие внешних антропогенных воздействий (Van Goethem et al., 2018).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ по научному проекту № 18-34-00658.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Булгакова В.Г., Виноградова К.А., Орлова Т.И., Кожевин П.А., Полин А.Н. Действие антибиотиков как сигнальных молекул // Антибиотики и химиотерапия. 2014. Т. 59. № 1–2. С. 36–43.
- Bulgakova V.G., Vinogradova K.A., Orlova T.I., Kozhevina P.A., Polin A.N. Action of antibiotics as signalling molecules // Antibiot. Khimioter. (Moscow). V. 59. № 1–2. P. 36–43.
- Миндлин С.З., Петрова М.А. О происхождении и распространении устойчивости к антибиотикам: результаты изучения древних бактерий из многолетнемерзлых отложений // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. С. 123–132.
- Mindlin S.Z., Petrova M.A. On the origin and distribution of antibiotic resistance: permafrost bacteria studies // Mol. Genet. Microbiol. Virol. (Moscow). V. 32. P. 169–179.
- Миндлин С.З., Соина В.С., Петрова М.А., Горленко Ж.М. Выделение устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий из многолетнемерзлых отложений Восточной Сибири // Генетика. 2008. Т. 44. С. 36–44.
- Mindlin S.Z., Soina V.S., Petrova M.A., Gorlenko Zh.M. Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from Eastern Siberia permafrost sediments // Rus. J. Genet. V. 44. P. 27–34.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Ashbolt N.J., Amézquita A., Backhaus T., Borriello P., Brandt K.K., Collignon P., Coors A., Finley R., Gaze W.H., Heberer T., Lawrence J.R., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Ryan J.J., Schönfeld J., Silley P., Snape J.R., Van den Eede C., Topp E. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance // Environ. Health Perspect. 2013. V. 121. P. 993–1001.
- Brown M.G., Balkwill D.L. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial surface // Microb. Ecol. 2009. V. 57. P. 484–493.
- Cytryn E. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 63. P. 18–23.
- D’Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R. Antibiotic resistance is ancient // Nature. 2011. V. 477. P. 457.
- Delcour A. Outer membrane permeability and antibiotic resistance // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 808–816.
- Durso L.M., Wedin D.A., Gilley J.E., Miller D.N., Marx D.B. Assessment of selected antibiotic resistances in ungrazed native Nebraska prairie soils // J. Environ. Qual. 2016. V. 45. P. 454–462.
- Hayward J.L., Jackson A.J., Yost C.K., Truelstrup H.L., Jamiesson R.C. Fate of antibiotic resistance genes in two Arctic tundra wetlands impacted by municipal wastewater // Sci. Total Environ. 2018. V. 642. P. 1415–1428.
- Heymann D.L., Prentice T., Reinders L.T. The World Health Report 2007: a Safer Future: Global Public Health Security in the 21st Century // World Health Organization. 2007.
- Khesin R.B., Karasyova E.V. Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 197. P. 280–285.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. New York: John Wiley & Sons, 1991. P. 125–175.
- Martínez J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments // Science. 2008. V. 321. P. 365–367.
- Martinez J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants // Environ. Pollut. 2009. V. 157. P. 2893–2902.
- Mindlin S.Z., Petrova M.A., Gorlenko Zh.M., Soina V.S., Khachikian N.A., Karaevskaya E.A. Multidrug-resistant bacteria in permafrost: isolation, biodiversity, phenotypic and genotypic analysis // New Permafrost and Glacier Re-

search / Eds. Krugger M.I., Stern H.P. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2009. P. 89–105.

Petrova M.A., Gorlenko Zh.M., Mindlin S.Z. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 296. P. 190–197.

Petrova M.A., Gorlenko Zh.M., Mindlin S.Z. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 337–345.

Petrova M.A., Shcherbatova N.A., Kurakov A.V., Mindlin S.Z. Genomic characterization and integrative properties of phiSMA6 and phiSMA7, two novel filamentous bacteriophages of *Stenotrophomonas maltophilia* // Arch. Virol. 2014. V. 159. P. 1293–1303.

Rothrock M.J., Keen P.L., Cook K.L., Durso L.M., Franklin A.M., Dungan R.S. How should we be determining background

and baseline antibiotic resistance levels in agroecosystem research? // J. Environ. Qual. 2016. V. 45. P. 420–431.

Sambrook J., Russel D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999 p.

Van Goethem M.W., Pierneef R., Bezuidt O.K., Van De Peer Y., Cowan D.A., Makhallanyane T.P. A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils // Microbiome. 2018. V. 6. P. 40.

Williams-Nguyen J., Sallach J.B., Bartelt-Hunt S., Boxall A.B., Durso L.M., McLain J.E., Singer R.S., Snow D.D., Ziles J.L. Antibiotics and antibiotic resistance in agroecosystems: state of the science // J. Environ. Qual. 2016. V. 45. P. 394–406.

Zhao Y., Cocerva T., Cox S., Tardif S., Su J.Q., Zhu Y.G., Brandt K.K. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils // Sci. Total Environ. 2019. V. 656. P. 512–520.

## Basic Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Different Biotopes

A. G. Kudinova<sup>1</sup>, V. S. Soina<sup>2</sup>, S. A. Maksakova<sup>2</sup>, and M. A. Petrova<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia

<sup>2</sup>Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: petrova@img.ras.ru

Received April 5, 2019; revised May 6, 2019; accepted May 29, 2019

**Abstract**—Soil is not only a habitat of antibiotic-resistant microorganisms and a natural source of antibiotic resistance genes, but also an environment in which clinical determinants of antibiotic resistance may be accumulated and transferred. Quantitative assessment of antibiotic-resistant bacteria in polluted soils used in agriculture and its comparison to the so-called baseline content of resistant bacteria and their resistance genes in the soil is therefore urgent. However, the data on the study of antibiotic-resistant bacteria in pristine soils (with minimal anthropogenic impact) are practically absent. Comparative study was therefore carried out on the spectra of resistance to natural and synthetic antibiotics among gram-negative bacteria isolated from various soils: pristine (Arctic and Antarctic soils); sites with possible pollution (sod-podzolic soils of a woodland park area in the Moscow region), and moderately polluted soils with high mercury content (near the Khaidarkan mercury mine). It was revealed that strains resistant to one or more of the used natural antibiotics, with the exception of tetracycline, were found in all types of biotopes. About one third of the studied strains, both isolated from soils of polar regions with low anthropogenic impact, and from polluted soils near the Khaidarkan mercury mine, exhibited multiple drug resistance. These results suggest that the presence of multiple antibiotic resistance in bacteria is not solely a response to anthropogenic pollution. Bacterial strains with multidrug antibiotic resistance isolated from the biotopes formed in extremely cold conditions belonged mainly to the genera among the representatives of which intrinsic resistance is widespread, due to the specific structure of their cell walls, preventing antibiotic penetration into the cell, and the to the presence of various nonspecific efflux systems of release of toxic substances from the cell.

**Keywords:** antibiotic resistance, Antarctic soils, Arctic soils, bacteria of extremely cold biotopes, bacterial resistance to mercury