



УДК 579.26

## ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К РИФАМПИЦИНУ У БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*



Е. Ю. Селиверстова, В. А. Выростков, Е. В. Яровая,  
М. П. Куликов, В. Ю. Дробот, И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина

Селиверстова Екатерина Юрьевна, аспирант кафедры экологии и природопользования Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, seliverstova9@yandex.ru

Выростков Владимир Андреевич, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, vova3270@gmail.com

Яровая Екатерина Васильевна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, ekyarova@sfedu.ru

Куликов Максим Павлович, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, makkulikov@sfedu.ru

Дробот Валерия Юрьевна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, drobot\_9626@mail.ru

Сазыкин Иван Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, issa@sfedu.ru

Сазыкина Марина Александровна, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, samara@sfedu.ru

Распространению антибиотикорезистентности среди бактерий в природе может способствовать антропогенный прессинг, оказываемый на экосистемы. В связи с этим целью настоящей работы состояла в исследовании влияния отдельных биоцидов, антибиотиков, пестицидов и тяжелых металлов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Для оценки влияния токсических веществ на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов в питательную среду перед посевом на чашки добавляли исследуемые вещества и рифампицин в конечной концентрации 100 мкг/мл. В ходе проведенного эксперимента было показано стимулирующее влияние клопиралида и глифосата на данный процесс. Наиболее ярко выраженный эффект наблюдался в случае применения глифосата в концентрации 0,67 мг/мл. Полученные в ходе исследования результаты указывают на высокий риск распространения устойчивости к антибиотикам среди микробных сообществ почв, подверженных обработке пестицидами.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas putida*, антибиотикорезистентность, рифампицин-устойчивые мутанты, рифампицин, клопиралид, глифосат.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>

### Введение

Проблема резистентности к антибиотикам в микробных сообществах в настоящее время является глобальной проблемой здравоохранения. Этому способствовало широкое использование препаратов данной группы вне клинических ситуаций, а также в животноводстве и птицеводстве, где они применяются не только для профилактики заболеваний, но и в качестве стимуляторов роста [1]. Известно, что темпы создания новых антибиотиков значительно снизились по сравнению с периодом с 1960 г. до середины 1980-х гг. [2].

В настоящее время значительное количество исследований посвящено поиску новых антибиотиков [3, 4]. Исследуется также вопрос комбинированного действия препаратов и перекрестной резистентности к антибиотикам [5].

Важно, однако, отметить, что проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида [6, 7]. Между тем антропогенный прессинг, оказываемый на экосистемы, может способствовать распространению антибиотикорезистентности среди бактерий в природе. Так, имеются данные, указывающие на связь между возникновением антибиотикорезистентности у бактерий и загрязнением почв тяжелыми металлами [8]. Кроме того, есть причины полагать, что широкое использование биоцидов связано с риском распространения бактерий, устойчивых к антибиотикам [9, 10]. Известно также о способности инсектицидов приводить к возрастанию резистентности к антибиотикам среди почвенных бактерий сельскохозяйственных почв [11], а также о существовании перекрестной резистентности к пестицидам и антибиотикам [12].



В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было выяснить влияние различных токсических веществ на примере отдельных антибиотиков, биоцидов, пестицидов и солей тяжелых металлов на возникновение устойчивости к рифампицину у бактерий рода *Pseudomonas*.

### Материалы и методы

#### *Бактериальные штаммы и условия их культивирования*

В работе использовался штамм *Pseudomonas putida*, выделенный из донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

Для культивирования штамма использовалась минимальная среда М9 с добавлением солянокислого гидролизата казеина и глюкозы в конечных концентрациях 0,4 и 0,2 % соответственно [13] и среда Лурия – Бергана (LB) при 30°C [14].

*Оценка влияния поллютантов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов Pseudomonas putida*

Для получения мутантов, устойчивых к рифампицину, штамм культивировали в жидкой среде М9 с добавлением гидролизата казеина и глюкозы в течение 21 ч при 30°C с использованием шейкера-инкубатора Innova 40R («New Brunswick») до достижения поздней логарифмической фазы роста.

Полученную культуру разводили средой М9 до плотности 1 ед. МакФарланда (мутность суспензии определяли при помощи денситометра DEN-1 «BioSan») и далее последовательно разводили до плотности  $10^5$  кл/мл, после чего культивировали в течение 18 ч при 30°C.

Ночную культуру разводили средой М9 до плотности  $\approx 1,8 \cdot 10^9$  кл/мл и в количестве 100 мкл вносили в чашки с плотной LB с добавлением среды М9 и рифампицина в конечных концентрациях 10% и 100 мкг/мл соответственно [13]. Для оценки влияния токсических веществ на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов в питательную среду перед посевом на чашки добавляли следующие исследуемые вещества в указанных концентрациях (в соответствии с инструкцией производителя, а также в 10 и в 100 раз меньше):

– пестициды: клопиралид («Лонтрел») в конечных концентрациях 30, 3 и 0,3 мкг/мл и глифосат (в виде изопропиламинной соли, «Агрокиллер») в конечных концентрациях 6700, 670 и 67 мкг/мл;

– биоциды: хлоргексидина биглюконат («Росбио») в конечных концентрациях 50, 5 и 0,5 мкг/мл и диоксидин («Новосибхимфарм») в

конечных концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл; – антибиотики: ампициллин («Синтез») в конечных концентрациях 25, 2,5 и 0,25 мкг/мл и окситетрациклина гидрохлорид («Агрофарм»): в конечных концентрациях 25, 2,5 и 0,25 мкг/мл.

Для оценки влияния солей тяжелых металлов на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов *Pseudomonas putida* были отобраны концентрации, не оказывающие угнетающего эффекта на клеточный метаболизм [15]:

– хлорид ртути ( $\text{HgCl}_2$ , «Акватест»): 27,2, 2,72 и 0,272 мкг/мл; – сульфат меди ( $\text{CuSO}_4$ , «Акватест»): 100, 10 и 1 мкг/мл.

Количество выросших колоний учитывали через 72 ч после начала инкубации. В качестве положительного контроля был использован N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин в конечной концентрации 5 мкг/мл. Отрицательным контролем служил посев на плотную питательную среду, дополненную лишь рифампицином.

Все опыты проводились в трех повторностях.

### Результаты и их обсуждение

*Влияние пестицидов, антибиотиков, биоцидов и солей тяжелых металлов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов Pseudomonas putida*

В результате проведенного исследования было показано стимулирующее влияние таких пестицидов, как клопиралид и глифосат на появление устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Связь между устойчивостью к пестицидам, в том числе и к глифосату, и резистентностью к антибиотикам на примере *Salmonella enterica* показана также Rivera-Ramírez с соавт. [16]. В проведенном нами исследовании наиболее ярко выраженный эффект наблюдался в случае применения глифосата в концентрации 670 мкг/мл (рис.1).

Клопиралид также оказал стимулирующее влияние на появление мутантов, однако менее выраженное и в самой высокой из исследуемых концентраций, которая рекомендована в качестве рабочей в инструкции по использованию данного вещества (рис. 2).

Ни одно из исследуемых веществ, относящихся к антибиотикам, пестицидам и солям тяжелых металлов, не оказало стимулирующего влияния на появление устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Напротив, такие вещества, как тетрациклин, диоксидин и хлорид ртути, во всех исследованных концентрациях (включая самые низкие) оказали ярко выраженное подавляющее действие на возникновение мутантов (рис. 3, 4, 5).

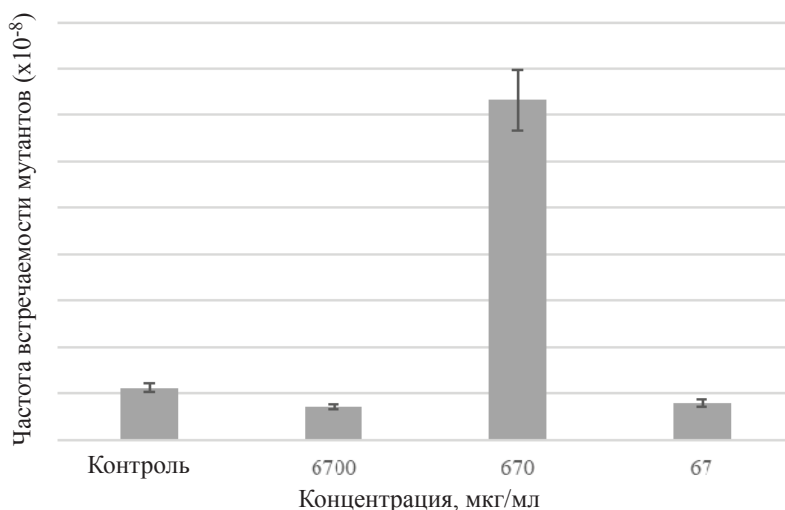


Рис. 1. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием глифосата

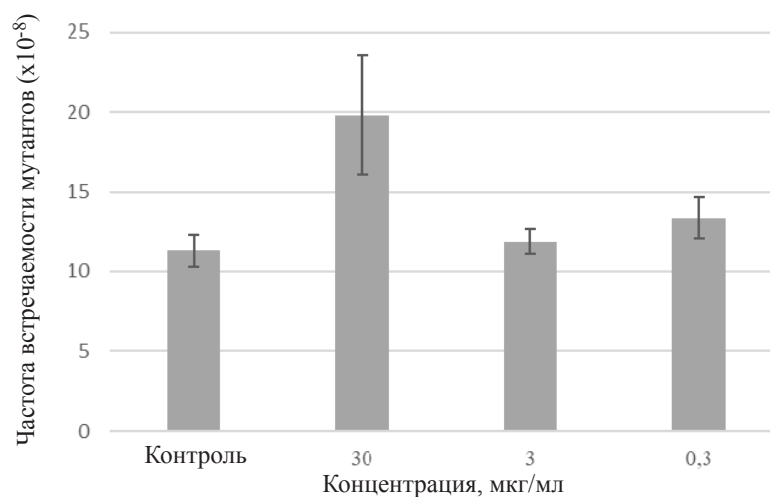


Рис. 2. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием клопиралида

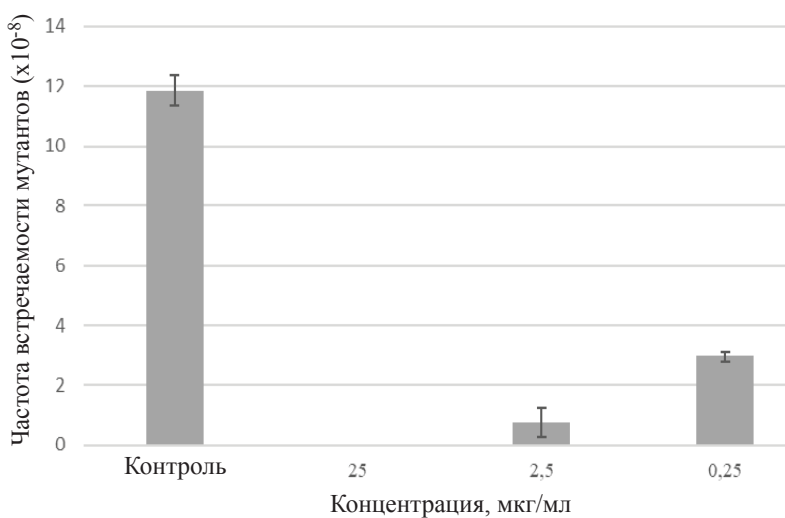


Рис. 3. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием тетрациклина

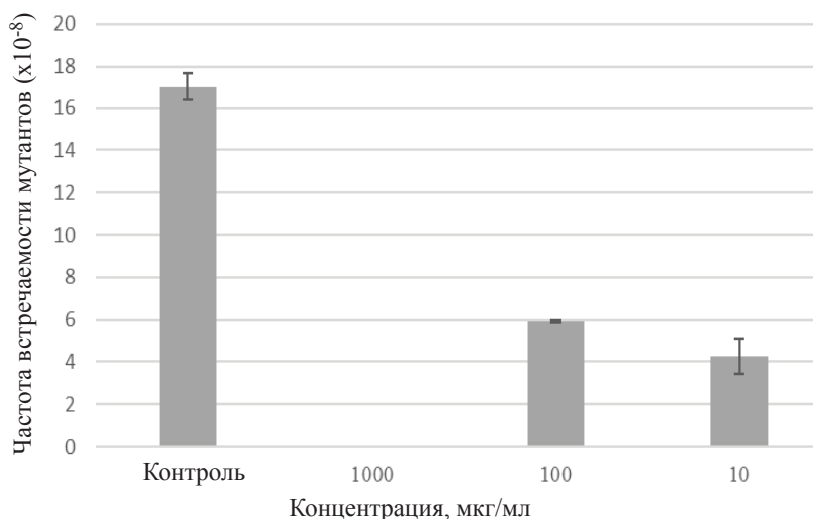


Рис. 4. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием диоксицина

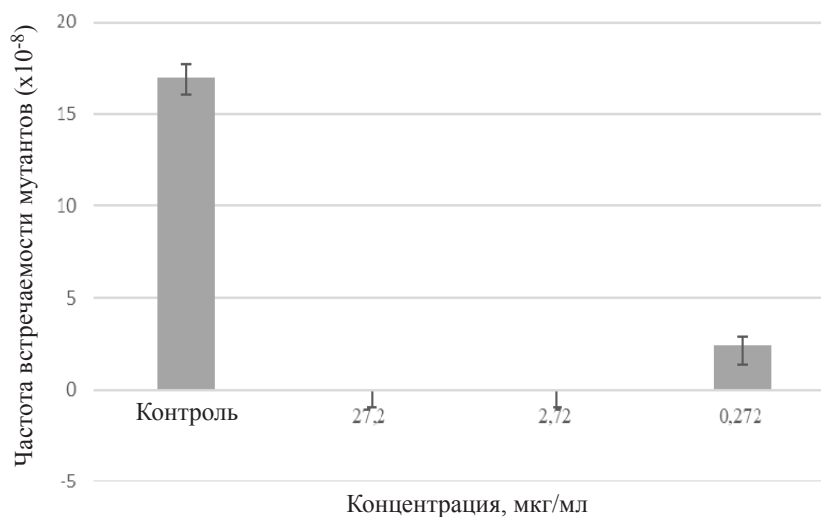


Рис. 5. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием  $HgCl_2$

В настоящее время роль биоцидов, антибиотиков и солей тяжелых металлов в распространении лекарственной устойчивости в микробных сообществах до конца не выявлена в связи с тем, что на данный процесс оказывают свое влияние различные факторы. Так, в проведенном нами исследовании ярко выраженный угнетающий эффект хлоргексидина на возникновение мутантов, устойчивых к рифампицину, был выявлен только при самой высокой из исследуемых концентраций хлоргексидина (50 мкг/мл), в то время как при использовании хлоргексидина в более низких концентрациях наблюдалось практически сопоставимое с контролем появление мутантов *Pseudomonas putida* (рис. 6). Это согласуется с данными, полученными Wu с соавт. [17] для *Staphylococ-*

*cus aureus*, свидетельствующими о повышении устойчивости к антибиотикам под воздействием хлоргексидина.

Напротив, под воздействием ампициллина и сульфата меди количество мутантов, приближающееся по значению к контролю, было выявлено в случае использования более высоких концентраций данных веществ: 25 и 100 мкг/мл соответственно (рис. 7, 8).

Вполне вероятно, что в определенных условиях эти вещества могут способствовать распространению лекарственной устойчивости в природных микробных сообществах, однако для подтверждения вышеописанной гипотезы требуется проведение дальнейших исследований с использованием бактерий различных родов и широкого спектра токсических веществ.

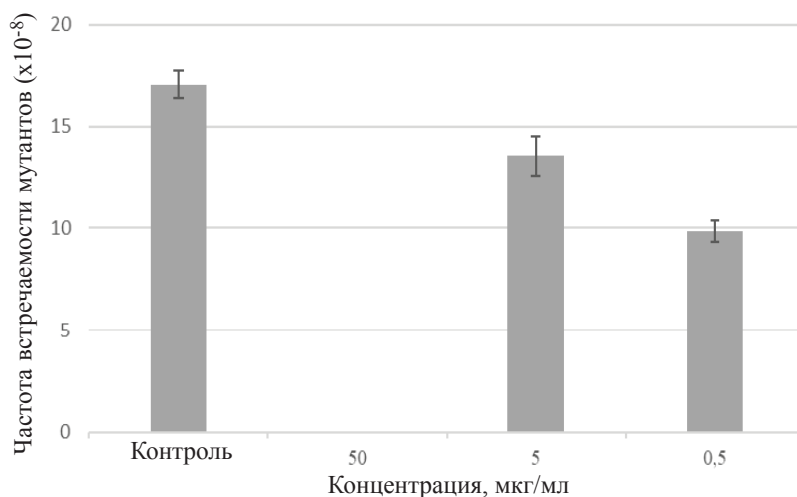


Рис. 6. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием хлоргексидина

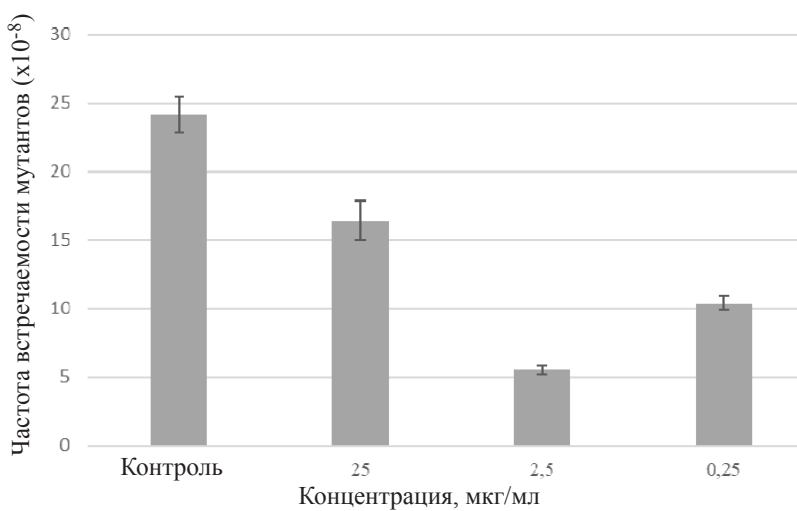


Рис. 7. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием ампициллина

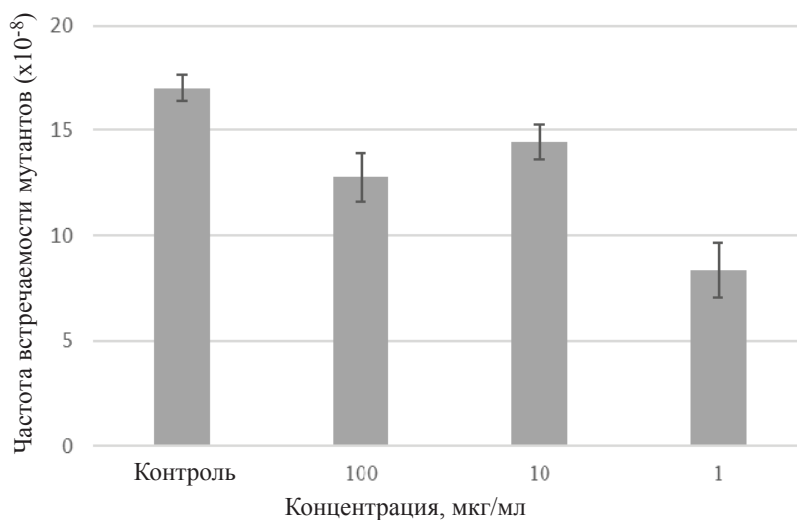


Рис. 8. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием  $\text{CuSO}_4$



### Заключение

Полученные в ходе исследования результаты указывают на высокий риск распространения устойчивости к антибиотикам среди микробных сообществ почв, подверженных обработке пестицидами. Тем не менее следует отметить, что данные были получены в результате лабораторного эксперимента и требуется дальнейшее изучение данной проблемы в условиях, приближенных к естественным.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.2379.2017/ПЧ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00787 А).

### Список литературы

1. Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Хмелевцова Л. Е., Хаммами М. И., Селиверстова Е. Ю. Антибиотики и гены антибиотикорезистентности в окружающей среде // Вестн. биотехнологии и физ.-хим. биологии им. Ю. А. Овчинникова. 2016. Т. 12, № 2. С. 30–40.
2. Yılmaz Ç., Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps // Biochem. Pharmacology. 2017. Vol. 133. P. 43–62.
3. Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., Conlon B. P., Mueller A., Schäberle T. F., Hughes D. E., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V. A., Cohen D. R., Felix C. R., Fetterman K. A., Millett W. P., Nitti A. G., Zullo A. M., Chen C., Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance // Nature. 2015. Vol. 517. P. 455–459.
4. Kim H. U., Blin K., Lee S. Y., Weber T. Recent development of computational resources for new antibiotics discovery // Current Opinion in Microbiology. 2017. Vol. 39. P. 113–120.
5. Suzuki S., Horinouchi T., Furusawa C. Suppression of antibiotic resistance acquisition by combined use of antibiotics // J. of Biosci. and Bioengineer. 2015. Vol. 120, № 4. P. 467–469.
6. Сунотницкий М. В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. 2011. № 2. С. 4–11.
7. Rolain J. M., Abat C., Jimeno M.-T., Fournier P.-E., Raoult D. Do we need new antibiotics? // Clinical Microbiology and Infection. 2016. Vol. 22, № 5. P. 408–415.
8. Safari Sinegani A. A., Younessi N. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses // J. of Global Antimicrob. Resist. 2017. Vol. 10. P. 247–255.
9. Weggate R., Grasha P., Maillard J.-Y. Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage // Amer. J. of Infect. Control. 2016. Vol. 44. P. 458–464.
10. Molina-González D., Alonso-Calleja C., Alonso-Hernando A. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains // Food Control. 2014. Vol. 40. P. 329–334.
11. Rangasamy K., Athiappan M., Devarajan N., Parray J. A. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides // Microb. Pathogen. 2017. Vol. 105. P. 153–165.
12. Rangasamy K., Athiappan M., Devarajan N., Samykanu G., Parray J. A., Aruljothi K. N., Shameem N., Alqarawi A. A., Hashem A., Abd-Allah E. F. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora // Microb. Pathogen. 2018. Vol. 114. P. 304–310.
13. Jatsenko T., Tover A., Tegova R., Kivisaar M. Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* // Mutation Res. 2010. Vol. 683. P. 106–114.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982. 479 p.
15. Сазыкина М. А., Чистяков В. А., Сазыкин И. С., Лагутова Л. П., Новикова Е. М., Латышев А. И. Использование бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью // Вода: химия и экология. 2010. № 5. С. 24–29.
16. Rivera-Ramírez X. O., Hernández-Ojeda S. L., Espinosa-Aguirre J. J., Camacho-Carranza R. Antibiotic resistance mutations in bacteria selected by exposure to pesticides // Toxicol. Lett. 2016. Vol. 259. Supplement. P. S218–S219. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.07.52
17. Wu D., Lu R., Chen Yu., Deng Chao., Tan Q. Study of cross-resistance mediated by antibiotics, chlorhexidine and Rhizoma coptidis in *Staphylococcus aureus* // J. of Global Antibiotic Resistance. 2016. № 7. P. 61–66.

### The Effect of Pollutants on the Emergence of Rifampicin Resistance in Bacteria of the *Pseudomonas* Genus

E. Yu. Seliverstova, V. A. Vyrostkov,  
E. V. Yarovaya, M. P. Kulikov, V. Yu. Drobot,  
I. S. Sazykin, M. A. Sazykina

Ekaterina Yu. Seliverstova, <https://orcid.org/0000-0002-2940-803X>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, seliverstova9@yandex.ru

Vladimir A. Vyrostkov, <https://orcid.org/0000-0001-8536-3297>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, vova3270@gmail.com

Ekaterina V. Yarovaya, <https://orcid.org/0000-0003-3192-8541>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, ekyarovaya@sfedu.ru

Maxim P. Kulikov, <https://orcid.org/0000-0002-0350-0145>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, Russia, 344090, makkulikov@sfedu.ru





Valeria Yu. Drobot, <https://orcid.org/0000-0002-7924-1696>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, [drobot\\_9626@mail.ru](mailto:drobot_9626@mail.ru)

Ivan S. Sazykin, <https://orcid.org/0000-0002-0864-1473>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, [issa@sfedu.ru](mailto:issa@sfedu.ru)

Marina A. Sazykina, <https://orcid.org/0000-0001-6974-3361>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, [samara@sfedu.ru](mailto:samara@sfedu.ru)

The anthropogenic pressure on ecosystems may contribute to the spread of antibiotic resistance among bacteria in natural conditions. Due to this, the aim of this work was to study the impact of specific biocides, antibiotics, pesticides and heavy metals on the emergence of rifampicin resistant mutants of *Pseudomonas putida*. To assess the impact of toxic substances on the emergence of rifampicin-resistant mutants the studied substances

and rifampicin in the final concentration of 100 µg/ml were added into nutrient medium before plating. In the course of the experiment the stimulating effects of clopyralid and glyphosate on the process were shown. The most pronounced effect was observed in the case of glyphosate application in the concentration of 0.67 mg/ml. The obtained results indicate high risk of spreading antibiotic resistance among the microbial communities of soils subjected to treatment with pesticides.

**Key words:** *Pseudomonas putida*, antibiotic resistance, rifampicin-resistant mutants, rifampicin, clopyralid, glyphosate.

**Acknowledgements:** *This work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of scientific (project no. 6.2379.2017/PC) and of the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 17-04-00787 A).*

---

**Образец для цитирования:**

Селиверстова Е. Ю., Выростков В. А., Яровая Е. В., Куликов М. П., Дробот В. Ю., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А. Влияние загрязняющих веществ на возникновение устойчивости к рифампицину у бактерий рода *Pseudomonas* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 439–445. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>

**Cite this article as:**

Seliverstova E. Yu., Vyrostkov V. A., Yarovaya E. V., Kulikov M. P., Drobot V. Yu., Sazykin I. S., Sazykina M. A. The Effect of Pollutants on the Emergence of Rifampicin Resistance in Bacteria of the *Pseudomonas* Genus. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 439–445 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>

---