

Б.Г. БАБАЯН, Н.А. ОГАНЕСЯН, А.С. САРГСЯН, М.А. МЕЛКУМЯН
РАЗЛИЧИЯ В ДЕЙСТВИИ EDTA НА РЕЗИСТЕНТНЫЕ И
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОЧВЕННЫЕ НЕПАТОГЕННЫЕ ШТАММЫ
PSEUDOMONAS MALTOPHILIA (STENOTROPHOMONAS
MALTOPHILIA)

Pseudomonas maltophilia (Stenotrophomonas maltophilia) широко распространены в природе и вовлечены в процессы биodeградации природных и синтетических ксенобиотиков. В данной работе исследованы отличия биodeградации хелатирующего агента EDTA (Трилона Б) резистентными и чувствительными к антибиотикам штаммами данного вида. Согласно полученным результатам, антибиотик-резистентные штаммы *Stenotrophomonas maltophilia* более чувствительны к EDTA, чем чувствительные представители того же вида.

Ключевые слова: *Pseudomonas maltophilia, Stenotrophomonas maltophilia*, биodeградация, антибиотикорезистентность, EDTA, плазмиды.

Введение. EDTA (Трилон Б, представляющий собой дигидрат двуназриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты) является одним из известных хелатирующих агентов, способным к комплексообразованию с катионами металлов (K, Na, Ca, Mo, Co, Cu, Ni, Zn, Fe, Mn, Al, Ga) и некоторыми (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CN^-) анионами. Поэтому, EDTA имеет широкое бытовое, промышленное и медицинское применение [1]. Его кальциево-натриевые производные маркированы в качестве пищевой добавки E 385 [2]. *S. Maltophilia (P. maltophilia)* распространены повсеместно и способны к биodeградации многих ксенобиотиков в почве [3]. Исследование воздействия EDTA на рост почвенных *S. maltophilia* представляет собой большую экологическую важность.

Методическое обоснование. В ходе данного исследования было изучено 15 штаммов почвенных непатогенных бактерий *S. Maltophilia* из коллекции микроорганизмов ЦДМ НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА на предмет сопоставления эффекта воздействия EDTA с их антибиотико-резистентностью. Для достижения поставленной цели были использованы микробиологические и молекулярно-генетические методы. Культивация штаммов проводилась на средах мясопептонного агара (МПА) и мясопептонного бульона (МПБ). Исследования резистентности проводились на селективных средах с 50 $\mu\text{г}/\text{мл}$ содержанием антибиотиков производства фирмы “Астория”: канамицина (Kan), стрептомицина (Str), ампициллина (Amp), амоксициллина (Amx), аугментина (Amc), цефиксима (Cfx), цефтриаксона (Ctx), азитромицина (Azm), ципрофлоксацина (Cip) и хлорамфеникола (Cam) [4]. Тотальная и плазмидная DNA

исследуемых бактерий выделялись соответственно термохимической обработкой с применением бензилхлорида и методом Долли. Электрофоретическое исследование DNA проводилось на 0,8...2,5% агарозном геле с бромидом этидия. Трансформация проводилась методом Манделя [5]. В качестве контрольных образцов использовались: *E.coli DH5 α* (чувствительный), *E.coli DH5 α /VOG16* (Kan-резистентный), *E.coli DH5 α /pUC18* (Amp-резистентный), *E.coli DH5 α /PEC7* (Cam-резистентный). PCR анализ DNA проводился с использованием следующих праймеров: *bla_{OXA10}* - для β -лактамазы; *aph(3')VI* - для O-фосфотрансферазы, *aac(6)II* - для N-ацетилтрансферазы; *pCAT639* - для хлорамфеникол ацетилтрансферазы CatB7. В качестве маркеров использовалась стандартная нарезка фрагментов EcoRI/HindIII [6 - 8].

Результаты. При добавлении 0,15М, 0,25М и 0,5М EDTA в культивационную среду было отмечено полное подавление роста штаммов *S. maltophilia* 9288, *S. maltophilia* 9290 и *S. maltophilia* 9302, а у штаммов *S. maltophilia* 9305, *S. maltophilia* 9294, *P. maltophilia* 9286, *S. maltophilia* 9257 ингибирования роста отмечено не было. У остальных штаммов наблюдался дозозависимый эффект подавления (табл. 1).

Таблица 1

Действие различных концентраций EDTA на штаммы *Stenotrophomonas maltophilia* (“+” - рост, “-” - отсутствие роста)

Штамм <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>								
EDTA	9288	9289	9290	9293	9294	9286	9280	9098
0,15M	-	+	-	+	+	+	+	-
0,25M	-	-	-	-	+	+	+	-
0,5M	-	-	-	-	+	+	-	-
Штамм <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>								
EDTA	9300	9302	9305	9308	9326	306d2	9257	
0,15M	+	+	+	+	+	+	+	
0,25M	+	-	+	-	+	-	+	
0,5M	-	-	+	-	+	-	+	

Данные исследования антибиотикорезистентности 15 изучаемых штаммов представлены в табл. 2.

Данные PCR анализа наличия генов антибиотико-резистентности показали наличие гена *aph(3')VI* – 2 kDa у *S. maltophilia* 306d2; у *S. maltophilia* 9302, *S. maltophilia* 306d2, *S. maltophilia* 9289 - *bla_{OXA10}* -1,6kb и у *S. maltophilia* 9289 – *aac(6)II*-2,2kb.

Таблица 2

Анализ антибиотикорезистентности различных штаммов *S. maltophilia*
 (“+” - рост, “-” - отсутствие роста)

Штамм	Kan	Stp	Cam	Amc	Amx	Amp	Cfx	Ctx	Tcn	Cip	Azm
<i>S. maltophilia</i>											
9288	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9289	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9286	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
9290	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
9293	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
9294	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9098	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9300	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
9302	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
9305	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
9326	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
306d2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9308	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
9057	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9280	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

При сравнении результатов анализа чувствительности различных штаммов *S. maltophilia* к наиболее широко применяемым представителям: амфениколов, аминогликозидных, β -лактамных, цефалоспориновых β -лактамов, тетрациклиновых, фтор-хинолонов и азалидных антибиотиков, выявлено 64% случаев мультирезистентности к более чем 2 классам антибиотиков; 20% абсолютной резистентности к аминогликозидам и β -лактамам с частичной устойчивостью к другим классам, 4% абсолютной чувствительности, 4% мультирезистентности при чувствительности Azm, Cip, а также 4% абсолютной резистентности.

Электрофоретическое исследование DNA показало, что плазмиды различной молекулярной массы были обнаружены у следующих штаммов: *S. maltophilia* 9282, *S. maltophilia* 9293, *S. maltophilia* 9280, *S. maltophilia* 9326, *S. maltophilia* 9308, *S. maltophilia* 9294, *S. maltophilia* 306d2, *S. maltophilia* 9098, *S. maltophilia* 9300, *S. maltophilia* 9305, *S. maltophilia* 9302.

Таблица 3

Сопоставление данных устойчивости к EDTA, антибиотикорезистентности, PCR и трансформационного анализа плазмидного состава различных штаммов *S. maltophilia*

Штамм	Наличие/отсутствие Плазмиды	PCR	Трансформация	R/S	EDTA
9302	+	<i>bla_{OXA10}-1,6kb</i>	+	<i>Amp^R, Amx^R, Amc^S</i>	-
9290	-	-	-	<i>Amc^S</i>	+
9293	+	-	+	<i>Amp^R</i>	-
9294	+	-	+		-
9257	-	-	-	<i>S</i>	-
9288	+	-	+	<i>Amp^R, Amx^R, Amc^R</i>	-
9305	+	-	+		-
9308	+	-	+		+
9300	+	-	+		-
9286	-	-	-		-
9289	+	<i>bla_{OXA10}-1,6kb aac (6') II-2,2kb</i>	+		-
9280	+	-	-		+
306d2	+	<i>aph(3')VI-2kDa</i>	+		-

Трансформация чувствительных штаммов плазмидной DNA антибиотико-резистентных представителей показала как плазмидную, так и нуклеотидную локализацию генов. Сопоставление данных резистентности к антибиотикам и EDTA, PCR и трансформационного анализа плазмидного состава штаммов приведено в табл. 3.

Заключение. Исследование воздействия различных концентраций EDTA выявило более сильное ингибирование роста у антибиотик-резистентных штаммов, нежели у чувствительных. Исследованные штаммы *S. Maltophilia* отличаются по своей резистентности и чувствительности как к антибиотикам разных классов, так и к различным представителям одного класса антибиотиков, проявляя моно- и мультирезистентность. Среди исследованных резистентных и чувствительных штаммов обнаружены как плазмидные, так и бесплазмидные представители, плазмиды которых как участвуют в антибиотикорезистентности, так и отвечают за другие функции метаболизма, что обуславливает

отсутствие передачи резистентности у части исследуемых штаммов при трансформации.

Отмечен большой ингибирующий эффект EDTA на резистентные штаммы при общем эффекте дозозависимого ингибирования. Это позволяет предположить для 11 из 15 изученных штаммов наличие системы предотвращения поступления вещества в клетки бактерий или его активное выведение системами эффлюкса, подобными описанным в литературе [9].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке МОН РА в рамках научного проекта № 18Т-21036.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Jiménez J.J.** Determination of calcium disodium ethylenediaminetetraacetate (E385) in marketed bottled legumes, artichokes and emulsified sauces by gas chromatography with mass spectrometric detection // Food Chem. – 2014. – 152. -P.81-7.
2. **Kadry A.A., Fouda S.I., Shibl A.M., Abu El-Asrar A.A.** Impact of slime dispersants & anti-adhesives on in vitro biofilm formation of Staphylococcus epidermidis on intraocular lenses and on antibiotic activities // J. of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. - 63 (3). - P. 480 – 484.
3. Stenotrophomonas maltophilia strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil / **I.A. Larik, M.A. Qazi, A.H. Phulpoto et al** // Int. J. Environ. Sci. Technol.-2018. - P.1-10.
4. **Szita G., Biró G.** A synthetic, selective culture medium for Pseudomonas aeruginosa // Acta Vet Hung.-1990.-38(3). - P.187-194.
5. **Lucotte G., Baneux F.** Introduction to Molecular Cloning Techniques.-Wiley-Blackwell, 1993. - 32 p. ISBN 978-0471188490.
6. Expansion of highly stable blaOXA-10 β -lactamase family within diverse host range among nosocomial isolates of Gram-negative bacilli within a tertiary referral hospital of Northeast India /**A.P. Maurya, D. Dhar, M.K. Basumatary, et al** // BMC Res Notes. – 2017. – 10. – P. 145.
7. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycosideresistance genes in Enterobacteriaceae /**X. Hu, B. Xu, Y. Yang, et al** // BMC Microbiology. – 2013. – V.13, doi: [10.1186/1471-2180-13-58]
8. **Wang J., Liu J.-H.** Mutations in the chloramphenicol acetyltransferase (S61G, Y105C) increase accumulated amounts and resistance in Pseudomonas aeruginosa, China Received // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – 236. - P.197–204.
9. **Todd R., Maie S., Maie R.M.** Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants // Environ Health Perspect. – 2003. - 111(8). - P.1093–1101.

**Բ.Գ. ԲԱԲԱՅԱՆ, Ն.Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա.Ս. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,
Մ.Ա. ՄԵԼՔՈՒՄՅԱՆ**

***PSEUDOMONAS MALTOPHILIA*-ի (*STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*-ի)
ՀՈՂԱՅԻՆ, ՈՉ ԱԽՏԱԾԻՆ ՀԱԿԱՔԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ՆԿԱՏՄԱՍԲ ԶԳԱՅՈՒՆ ԵՎ
ԿԱՅՈՒՆ ՇՏԱՄՆԵՐԻ ՎՐԱ EDTA-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՏԱՐԲԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Pseudomonas maltophilia-ն (*Stenotrophomonas maltophilia*-ն) լայնորեն տարածված է բնության մեջ և ներգրավված է բնական և սինթետիկ քսենոֆիոտիկների կենսադեգրադացման գործընթացներում: Աշխատանքում ուսումնասիրվել են հակաբիոտիկակայուն և զգայուն շտամների վրա EDTA-ի ազդեցության տարբերությունները: Ստացված արդյունքների համաձայն՝ հակաբիոտիկակայուն շտամները ավելի զգայուն են EDTA-ի ազդեցության նկատմամբ, քան նույն տեսակի զգայուն ներկայացուցիչները:

Առանցքային բառեր. *Pseudomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia* բիոդեգրադացում, հակաբիոտիկակայունություն, EDTA, պլազմիդներ:

**B.G. BABAYAN, N.A. HOVHANNESYAN, A.S. SARGSYAN,
M.A. MELKUMYAN**

**THE DIFFERENCES IN INFLUENCE OF EDTA ON ANTIBIOTIC
RESISTANT AND SENSITIVE STRAINS OF SOIL NON-PATHOGENIC
STRAINS OF *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* (*STENOTROPHOMONAS
MALTOPHILIA*)**

Pseudomonas maltophilia (*Stenotrophomonas maltophilia*) is common in nature, which are involved in biodegradation of natural and synthetic xenobiotics. In present work, the differences between the effect of EDTA on antibiotic resistant and sensitive strains of *Pseudomonas maltophilia* are described. According to the obtained data, antibiotic resistant strains are more sensitive to EDTA than the sensitive representatives of the same species.

Keywords: *Pseudomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, biodegradation, antibiotic resistance, EDTA, plasmids.