

Влияние условий культивирования на передачу генов антибиотикорезистентности у холерного вибриона

*Н. А. СЕЛЯНСКАЯ, С. В. ТИТОВА, Е. А. МЕНЬШИКОВА,
С. О. ВОДОПЬЯНОВ, В. Д. КРУГЛИКОВ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Резюме

Рост антибиотикорезистентности вызывает необходимость изучения процессов приобретения и утраты генетических элементов, ответственных за устойчивость. Цель исследования — изучить влияние температуры, биоплёнкообразования и антибиотиков на эффективность переноса интегративного конъюгативного элемента (ICE) в штаммах *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Материал и методы. Осуществляли конъюгативную передачу ICE-элемента из штаммов *V. cholerae* O1 El Tor клеткам *Escherichia coli* QD 5003 Rif^r и *V. cholerae* O1 El Tor 5879 Nal^r в планктоне и в биоплёнках на пластике и хитине при 25–37°C. Наличие ICE определяли по гену интегразы (*int*). Трансконъюганты тестировали на чувствительность к антибиотикам и на наличие генов устойчивости к тетрациклинам (*tetR*), фторхинолонам (*qnrVCI*), триметоприму (*dfrAI*) и хлорамфениколу (*floR*). Индукцию конъюгации проводили субингибирующими концентрациями ципрофлоксацина, доксициклина, триметоприма/сульфаметоксазола, стрептомицина. Результаты. Эффективность конъюгации в биоплёнках была выше, чем в планктоне, и снижалась при понижении температуры. Стрептомицин и триметоприм/сульфаметоксазол стимулировали конъюгацию в биоплёнках на хитине. Доксициклин и ципрофлоксацин увеличивали частоту конъюгации в планктоне. Заключение. Температура и биоплёнкообразование влияют на передачу генов антибиотикорезистентности у холерных вибрионов. В условиях сложной биоплёнки, по сравнению с планктонной формой, происходит повышение эффективности конъюгации между холерными вибрионами и другими представителями семейства Enterobacteriaceae, более выраженное на биотическом субстрате (хитине) и при 37°C. Субингибирующие концентрации антибиотиков могут как стимулировать, так и подавлять процесс конъюгации в биоплёнках. Необходимо решение экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды пластиковым мусором и антибиотиками, соблюдение дозировок при назначении средств этиотропной терапии, поиск веществ, подавляющих передачу генов антибиотикорезистентности, либо способствующих элиминации имеющихся мобильных генетических элементов, ответственных за антибиотикорезистентность.

Ключевые слова: холерные вибрионы; конъюгация; ICE-элемент; гены антибиотикорезистентности

Для цитирования: Селянская Н. А., Титова С. В., Меньшикова Е. А., Водопьянов С. О., Кругликов В. Д. Влияние условий культивирования на передачу генов антибиотикорезистентности у холерного вибриона. Антибиотики и химиотер. 2024; 69 (9–10): 4–10. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-4-10>. EDN: QYNJYC

Influence of Cultivation Conditions on the Transmission of Antibiotic Resistance Genes in *Vibrio cholerae*

*NADEZHDA A. SELYANSKAYA, SVETLANA V. TITOVA, ELENA A. MENSHIKOVA,
SERGEY O. VODOPYANOV, VLADIMIR D. KRUGLIKOV

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

Abstract

The growth of antibiotic resistance necessitates studying the processes of acquisition and loss of genetic elements responsible for resistance. The aim of the study was to investigate the effect of temperature, biofilm formation, and antibiotics on the efficiency of integrative conjugative element (ICE) transfer in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains. Material and methods. Conjugative transfer of the ICE element from *V. cholerae* O1 El Tor strains to *Escherichia coli* QD 5003 Rif^r and *V. cholerae* O1 El Tor 5879 Nal^r cells was carried out in plankton and in biofilms on plastic and chitin at 25–37°C. The presence of ICE was determined by the integrase gene (*int*). Transconjugants were tested for antibiotic sensitivity and for the presence of resistance genes to tetracyclines (*tetR*), fluoroquinolones (*qnrVCI*), trimethoprim (*dfrAI*), and chloramphenicol (*floR*). Conjugation was induced by subinhibitory concentrations of ciprofloxacin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, and streptomycin. Results. Conjugation efficiency was higher in biofilms than in plankton, and lower with decreasing temperature. Streptomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole stimulated conjugation in chitinous biofilms. Doxycycline and ciprofloxacin increased conjugation frequency in plankton. Conclusion. Temperature and biofilm formation affect the transfer of antibiotic resistance genes in *V. cholerae*. In complex biofilm conditions, compared to the planktonic form, there is an increase in the efficiency of conjugation between *V. cholerae* and other representatives of the Enterobacteriaceae family, which is more pronounced on the biotic substrate (chitin) and at 37°C. Subinhibitory concentrations of antibiotics can both stimulate and suppress the conjugation process in biofilms. It is necessary to solve environmental problems as-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: ppdn@inbox.ru



*Correspondence to:
E-mail: ppdn@inbox.ru



sociated with environmental pollution by plastic waste and antibiotics, and to observe dosages when prescribing etiotropic therapy, as well as to search for substances that suppress the transfer of antibiotic resistance genes or promote the elimination of existing mobile genetic elements responsible for antibiotic resistance.

Keywords: *Vibrio cholerae*, conjugation, ICE element, antibiotic resistance genes.

For citation: Selyanskaya N. A., Titova S. V., Menshikova E. A., Vodopyanov S. O., Kruglikov V. D. Influence of cultivation conditions on the transmission of antibiotic resistance genes in *Vibrio cholerae*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (9–10): 4–10. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-4-10>. EDN: QYNJYC

Введение

Устойчивость бактерий к антибиотикам представляет собой растущую угрозу для глобального здравоохранения. Решающую роль в распространении генов устойчивости к антибиотикам среди бактериальных популяций играют мобильные генетические элементы (ICE). *Vibrio cholerae*, этиологический агент холеры, обладает способностью приобретать ICE-элементы путём конъюгации и встраивать их в свой геном для структурирования метаболических процессов, развития лекарственной устойчивости и колонизации кишечника человека. ICE представляют собой большие геномные сегменты, несущие несколько бактериальных адаптивных функций, включая устойчивость к противомикробным препаратам. У возбудителя холеры в составе ICE обнаружены гены, кодирующие устойчивость к тетрациклину (*tetA*), триметоприму/сульфаметоксазолу (*dfpA1* и *sul2*), стрептомицину (*strAB*), хлорамфениколу (*floR*) и др. [1]. Эти элементы несут в себе также гены, кодирующие аппарат конъюгации, которая осуществляется путём физического контакта клеток и одностороннего переноса ДНК донора через специальные морфологические структуры (пили) в клетку реципиента [2]. Реакция бактериального стресса «SOS-ответ» у *V. cholerae* играет ключевую роль в индукции переноса ICE-элемента и стимулируется различными факторами окружающей среды, в число которых входят антибиотики [3], тяжёлые металлы, облучение солнечным или ультрафиолетовым светом [4, 5].

Холерные вибрионы способны образовывать биоплёнки, в составе которых они более устойчивы к действию неблагоприятных факторов, в том числе антибиотиков [6]. С одной стороны, биоплёнки обеспечивают уникальные условия роста, при которых между клетками происходит тесный контакт, что способствует передаче генов множественной лекарственной устойчивости путём конъюгации [7]. С другой стороны, экзополисахаридный матрикс препятствует проникновению в глубокие слои биоплёнки генетических элементов [8], защищает от воздействия стрессовых факторов, что может снижать эффективность конъюгативного переноса. Большое влияние на частоту конъюгации оказывает физиологическое состояние клеток, состав клеточной стенки, доступность энергии, условия культивирования, в частности pH, температура, антибиотики [9–12].

На сегодняшний день воздействие факторов окружающей среды на перенос генов устойчивости к антибиотикам в бактериальных популяциях недостаточно изучено, а имеющиеся знания противоречивы, в связи с чем актуальным является изучение процессов приобретения и утраты генетических элементов, ответственных за устойчивость *V. cholerae* к различным антибактериальным препаратам.

Цель исследования — изучить влияние температуры, биоплёнкообразования и антибиотиков на эффективность переноса интегративного конъюгативного элемента (ICE) в штаммах *V. cholerae* O1 El Tor.

Материал и методы

Все штаммы, использованные в работе, получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: *V. cholerae* O1 El Tor (ctx+tcp+), содержащие ICE-элемент, выделенные на территории Российской Федерации в 2010–2012 гг. от людей (19667, 19242, 19188, 18899, 19191) и из объектов окружающей среды (19241), которые служили донорами в опытах конъюгации. Штаммы *Escherichia coli* QD 5003Rif^r и *V. cholerae* O1 El Tor (ctx+tcp+) 5879 Nal^r, не содержащие ICE-элемент, взяты в качестве реципиентов в прямых и обратных кроссах, соответственно.

Конъюгативную передачу *r*-детерминант резистентности, входящих в ICE-элемент, от штаммов холерных вибрионов клеткам *E. coli* QD 5003 Rif^r и в обратных кроссах от полученных трансконъюгантов клеткам *V. cholerae* O1 El Tor 5879 Nal^r в планктоне проводили по стандартной методике [13]. Для определения эффективности конъюгативной передачи в бактериальных сообществах формировали сложные биоплёнки на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus* и пластинках пищевого пластика при температурах 25±2°C или 37±2°C методом, описанным ранее [14]. Биоплёнки получали в течение 48 ч, трижды промывали для удаления неприкреплённых клеток, затем помещали в эппендорфы и подвергали разрушению на аппарате Vortex в течение 3 мин при максимальной мощности. Производили высев планктонных или биоплёночных культур на плотные питательные среды, содержащие антибактериальные препараты для селекции трансконъюгантов и контрселекции донора и реципиента (триметоприм — 8 мг/л и рифампицин — 200 мг/л или налидиксовая кислота — 100 мг/л).

Для изучения влияния субингибирующих концентраций антибиотиков на конъюгативную передачу *r*-детерминант резистентности, входящих в ICE-элемент, в смесь культур в планктоне или во флаконы с формирующимися биоплёнками предварительно добавляли субингибирующие концентрации антибактериальных препаратов (ципрофлоксацина, доксицилина, триметоприма/сульфаметоксазола, стрептомицина), которые определялись на основе минимальной подавляющей концентрации (МПК), в соответствии с Методическими указаниями 4.2.2495-09 [15] и 4.2.3745-22 [16].

Частоту передачи подсчитывали отношением числа выросших трансконъюгантов к общему числу живых бактерий, использованных для посева.

Выделение ДНК, проведение ПЦР и учёт результатов проводили по известной методике [17, 18]. В качестве маркера для обнаружения ICE-элемента в штаммах использовался ген интегразы *int* [19]. Для подтверждения факта переноса генов отобранные трансконъюганты тестировали на чувствительность к антибиотикам и на наличие генов лекарственной устойчивости к тетрациклинам (*tetR*), фторхинолонам (*qnrVCI*), триметоприму (*dfrA1*) и хлорамфениколу (*floR*), которые выявляли с помощью ПЦР в формате реального времени [20].

Для проведения статистической обработки результаты экспериментов были разбиты на две группы: первая — кроссы от штаммов холерных вибрионов клеткам *E. coli* QD 5003 *Rif^r*, вторая — обратные кроссы от полученных трансконъюгантов *E. coli* QD 5003 *Rif^r + R* клеткам *V. cholerae* O1 El Tor 5879 *Nal^r*. Достоверность различий в эффективности конъюгации в каждой группе определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. В качестве контроля сравнения принимали частоту передачи генов при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в каждом из субстратов в отсутствии антибактериальных препаратов (АБП). Также определяли достоверность различий в эффективности конъюгации в планктоне и в биоплёнках без АБП при разных температурах и между группами.

Результаты и обсуждение

На плотных питательных средах, содержащих антибактериальные препараты для селекции

трансконъюгантов и контрселекции донора и реципиента как в прямых (первая группа штаммов — от *V. cholerae* O1 El Tor к *E. coli* QD5003 *Rif^r*), так и в обратных кроссах (вторая группа — от *E. coli* QD5003 *Rif^r + R* к *V. cholerae* O1 El Tor 5879 *Nal^r*), были получены трансконъюганты, которые имели устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу, как и штаммы-доноры, а также гены устойчивости к триметоприму *dfrA1* при их отсутствии у штамма-реципиента. Наличие гена интегразы (*int*) у штаммов-доноров и трансконъюгантов свидетельствует о присутствии ICE-элемента (табл. 1).

Частота передачи ICE-элемента в прямых и обратных кроссах, рассчитанная как средний показатель для каждой группы исследуемых штаммов (по 6), представлена на рисунке (*a, b*) и в табл. 2.

Как видно из рисунка, без воздействия АБП так же как и в их присутствии, в обеих группах экспериментов при двух температурных режимах наблюдалось увеличение эффективности конъюгации в биоплёнках в сравнении с планктоном, более выраженное на хитине. При этом при по-

Таблица 1. Фено- и генотипы штаммов-доноров (Д), штаммов-реципиентов (Р) и полученных трансконъюгантов (Т)

Table 1. Phenotypes and genotypes of donor strains (Д), recipient strains (Р) and obtained transconjugants (Т)

Штаммы микроорганизмов		Фенотипы*	Гены**				
			<i>qnr</i>	<i>dfrA1</i>	<i>floR</i>	<i>tet</i>	<i>int</i>
Р	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r</i>	<i>Rif^r</i>	—	—	—	—	—
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19667	<i>Nal^rTmp/Smz</i>	—	+	+	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₆₆₇	<i>Rif^rTmp/Smz</i>	—	+	+	—	+
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19241	<i>Fur^rNal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₂₄₁	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19242	<i>Fur^rNal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₂₄₂	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19188	<i>Fur^rNal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₁₈₈	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18899	<i>Fur^rNal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₈₈₉₉	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19191	<i>Fur^rNal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₁₉₁	<i>Rif^rSmTmp/SmzSm</i>	—	+	—	—	+
Р	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i>	<i>Nal^r</i>	—	—	—	—	—
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₆₆₇	<i>Rif^rTmp/Smz</i>	—	+	+	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₉₆₆₇	<i>Nal^rTmp/Smz</i>	—	+	+	—	+
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₂₄₁	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₉₂₄₁	<i>Nal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₂₄₂	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₉₂₄₂	<i>Nal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₁₈₈	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₉₁₈₈	<i>Nal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₈₈₉₉	<i>Rif^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₈₈₉₉	<i>Nal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+
Д	<i>E. coli</i> QD <i>Rif^r + R</i> ₁₉₁₉₁	<i>Rif^rSmTmp/SmzSm</i>	—	+	—	—	+
Т	<i>V. cholerae</i> O1 5879 <i>Nal^r + R</i> ₁₉₁₉₁	<i>Nal^rSmTmp/Smz</i>	—	+	—	—	+

Примечание. * — маркеры устойчивости: *Nal^r* — к налидиксовой кислоте; *Rif^r* — к рифампицину; *Sm* — к стрептомицину; *Cm* — к левомицетину; *Tmp/Smz* — к триметоприму/сульфаметоксазолу. ** — гены: *int* — интегразы; *qnr* — устойчивости к фторхинолонам; *dfrA1* — устойчивости к триметоприму; *floR* — устойчивости к левомицетину; *tet* — устойчивости к тетрациклину; «±» — наличие либо отсутствие признака.

Note. * — resistance markers: *Nal^r* — to nalidixic acid; *Rif^r* — to rifampicin; *Sm* — to streptomycin; *Cm* — to chloramphenicol; *Tmp/Smz* — to trimethoprim/sulfamethoxazole. ** — genes: *int* — integrase; *qnr* — resistance to fluoroquinolones; *dfrA1* — resistance to trimethoprim; *floR* — resistance to chloramphenicol; *tet* — resistance to tetracycline; «±» — presence or absence of a trait.

нижении температуры до $25\pm 2^\circ\text{C}$ все показатели были ниже, чем при $37\pm 2^\circ\text{C}$.

Увеличение конъюгативного переноса в биоплёнках связано с продукцией внеклеточного матрикса, который создаёт идеальный биофизический контакт между клетками [21]. Хитин богат питательными веществами, способствующими размножению холерных вибрионов [22], чем можно объяснить более высокую частоту конъюгации в биоплёнках, образованных на хитине, в сравнении с пластиком. При понижении температуры создаются менее благоприятные условия для процессов конъюгации, что согласуется с данными литературы [23].

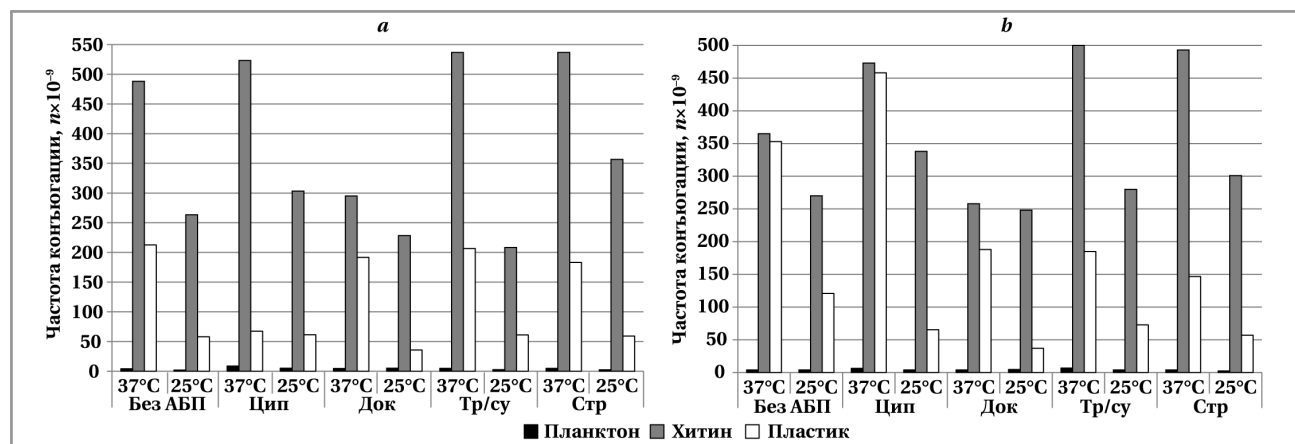
В первой группе исследуемых штаммов без воздействия АБП при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ в планктоне эффективность конъюгации составила $(4,18\pm 0,78)\times 10^{-9}$ (см. табл. 2). В составе сложной биоплёнки, образованной клетками вибриона и кишечной палочки на хитине, при такой же температуре частота образования трансконъюгантов была достоверно выше более чем в 100 раз (на 1–2 порядка) и составила $(488,3\pm 91,0)\times 10^{-9}$. На пластике, хоть увеличение частоты конъюгации не было статистически значимым $(212,50\pm 84,08)\times 10^{-9}$, но было близко к пределу значимости ($p=0,0054$) (табл. 2). Понижение температуры культивирования до $25\pm 2^\circ\text{C}$ вызвало статистически значимое снижение эффективности конъюгации в планктоне $(1,92\pm 0,34)\times 10^{-9}$ и в биоплёнках на хитине $(263,33\pm 43,64)\times 10^{-9}$, но не повлияло на значения частоты конъюгации в биоплёнках, образованных на пластике, отличия которых оказались не достоверными.

Во второй группе штаммов значения частоты конъюгации без воздействия АБП на всех субстратах и при обоих режимах культивирования не отличались от значений, полученных в первой группе. В этой группе при $37\pm 2^\circ\text{C}$ эффективность конъюгации в биоплёнках на пластике и хитине без АБП была достоверно выше, чем в планктоне, и составила $(353,33\pm 27,77)\times 10^{-9}$ и $(365,0\pm 62,17)\times 10^{-9}$ против $(4,0\pm 0,73)\times 10^{-9}$. Понижение температуры культивирования до $25\pm 2^\circ\text{C}$ вызывало достоверное снижение частоты получения трансконъюгантов лишь в биоплёнках, образованных на пластике $((120,83\pm 12,41)\times 10^{-9})$.

В присутствии субингибирующих концентраций антибиотиков эффективность конъюгации изменялась по-разному в зависимости от субстрата и температуры культивирования (см. табл. 2).

В первой группе штаммов стрептомицин не оказывал значимого воздействия на эффективность конъюгации в планктоне и в биоплёнках, образованных на пластике при $37\pm 2^\circ\text{C}$. Изменение температуры до $25\pm 2^\circ\text{C}$ существенно не повлияло на перенос ICE-элемента в этих субстратах. В биоплёнках, сформированных на хитине, в присутствии данного антибиотика наблюдалось достоверное увеличение показателей передачи при обеих температурах.

Добавление доксициклина в планктон, а также в среду формирования биоплёнок на пластике при $37\pm 2^\circ\text{C}$ и $25\pm 2^\circ\text{C}$ существенно не влияло на эффективность получения трансконъюгантов. Достоверно значимое увеличение частоты конъюгации в планк-



Частота передачи ICE-элемента в прямых и обратных кроссах, рассчитанная как средний показатель для каждой группы исследуемых штаммов (по 6), представлена на рис. (a, b) и в табл. 2.

Примечание. АБП — антибактериальный препарат; Цип — ципрофлоксацин; Док — доксициклин; Тр/су — триметоприм/сульфаметоксазол; Стр — стрептомицин. Частота конъюгации при разных условиях культивирования: a — в кроссах от *V. cholerae* к *E. coli* QD5003 *Rif*^r (первая группа); b — в кроссах от *E. coli* *Rif*^r + R к *V. cholerae* O1 5879 *Nal*^r (вторая группа).

The frequency of ICE element transmission in direct and reverse crosses, calculated as the average for each group of the studied strains (6 each), is presented in Fig. (a, b) as well as in Table 2.

Note. ABP — antibacterial drug; Цип — ciprofloxacin; Док — doxycycline; Тр/су — trimethoprim/sulfamethoxazole; Стр — streptomycin. Conjugation frequency under different cultivation conditions: a — in cross-reactions between *V. cholerae* to *E. coli* QD5003 *Rif*^r (first group); b — in cross-reactions between *E. coli* *Rif*^r + R to *V. cholerae* O1 5879 *Nal*^r (second group).

Таблица 2. Частота образования трансконъюгантов при разных условиях культивирования
Table 2. Frequency of transconjugant formation under different culture conditions

Группа штаммов	t, °C±2	Антибактериальный препарат и дозировка, мг/л	Частота образования трансконъюгантов в субстратах, (M±m)×10 ⁻⁹		
			планктон	пластик	хитин
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor — <i>E. coli</i> QD5003 Rif ^r	37	Без АБП	4,18±0,78	212,5±84,08	488,3±91,0 [#]
		Стрептомицин, 1,0	4,75±0,84	183,3±37,8	536,7±80,6*
		Доксициклин, 0,01	4,70±1,25	191,67±24,0	295,0±84,0
		Триметоприм/сульфаметоксазол, 0,5	4,83±0,90	206,7±50,2	536,7±84,6*
		Ципрофлоксацин, 0,0001	8,80±0,56*	67,33±6,65*	523,3±81,7
	25	Без АБП	1,92 ±0,34*	58,00±16,89	263,33±43,64*
		Стрептомицин, 1,0	2,37±0,29	59,33±9,22	356,7±48,6**
		Доксициклин, 0,01	5,20±1,269*	35,67±11,67	228,3±55,1
		Триметоприм/сульфаметоксазол, 0,5	2,62±0,60	61,17±13,37	208,33±71,33
		Ципрофлоксацин, 0,0001	5,18 ±0,89*	61,50±8,18	303,33±38,87**
<i>E. coli</i> QD5003 Rif ^r + R — <i>V. cholerae</i> O1 5879 Nal ^r	37	Без АБП	4,0±0,73	353,33±27,77 [#]	365,0±62,17 [#]
		Стрептомицин, 1,0	3,97±0,62	146,67±14,98	493,33±42,48
		Доксициклин, 0,01	6,83±1,14	188,33±19,05	258,33±65,44
		Триметоприм/сульфаметоксазол, 0,5	4,47±0,82	185,00±31,28	535,0±86,13
		Ципрофлоксацин, 0,0001	6,20±0,52	458,33±42,77	473,33±50,77
	25	Без АБП	3,97±0,83	120,83±12,41*	270,00±32,15
		Стрептомицин, 1,0	2,33±0,21	57,0±7,97	301,67±47,08
		Доксициклин, 0,01	4,08±0,72	37,17±11,73	248,33±38,94
		Триметоприм/сульфаметоксазол, 0,5	4,0±0,52	72,83±16,57	280,0±36,06
		Ципрофлоксацин, 0,0001	3,95±0,624	65,33±5,43	338,33±30,92**

Примечание. t, °C — температура инкубации во время конъюгации; M — средний показатель в группе исследуемых штаммов; m — ошибка средней; * — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) в сравнении со значением на данном субстрате без АБП при 37°C; ** — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) в сравнении со значением на данном субстрате без АБП при 25°C; # — достоверность отличий ($p \leq 0,05$) в сравнении со значением в планктоне.

Note. t, °C — incubation temperature during conjugation; M — average value in the group of studied strains; m — standard error of the mean; * — significance of differences ($P \leq 0.05$) compared with the value on a given substrate without ABP at 37°C; ** — significance of differences ($P \leq 0.05$) compared with the value on a given substrate without ABP at 25°C; *** — significance of differences ($P \leq 0.05$) compared with the value in plankton.

тоне происходило только при одновременном воздействии доксициклина и температуры 25±2°C.

В нашем исследовании переносимый ICE-элемент содержал гены устойчивости к триметоприму dfrA1. Триметоприм /сульфаметоксазол достоверно повышал частоту конъюгативного переноса в биоплёнках на хитине при 37±2°C, но в сочетании с температурой 25±2°C изменения были недостоверны. По мнению Н. Ма и J. D. Bryers [24], биоплёночные бактерии «чувствуют» антибиотики, к которым они устойчивы, что способствует распространению резистентности. Авторы наблюдали десятикратное увеличение эффективности переноса плазмиды, содержащей ген устойчивости к канамицину, в биоплёнках *Pseudomonas putida*, подвергшихся воздействию субингибирующей дозы этого антибиотика. Однако в присутствии другого антибиотика — имипенема, перенос этой плазмиды не увеличивался.

При воздействии ципрофлоксацина в планктоне наблюдали статистически значимое увеличение эффективности конъюгации при обеих температурах. Этот антибиотик вызывал достоверное увеличение частоты получения трансконъюгантов на хитине при 25±2°C, хотя на пластике этот показатель достоверно снижался при 37±2°C.

Ципрофлоксацин стимулировал процесс конъюгации в биоплёнках, образованных на хи-

тине при температуре 25±2°C и во второй группе штаммов. При этом другие АБП не вызывали достоверного изменения частоты образования трансконъюгантов (см. табл. 2).

Фторхинолоновые антибиотики вызывают повреждение ДНК, которое может стимулировать SOS-реакцию репарации ДНК. J. W. Beaber и соавт. [25] было показано, что в присутствии антибиотиков гены SOS стимулируют конъюгацию между *V. cholerae* и *E. coli*. Аналогично, другие зарубежные исследователи пришли к выводу, что регулятор CroS является ключевым фактором стимуляции конъюгативной передачи ICE в ответ на ДНК-разрушающие агенты [26]. В исследованиях R. S. Mohanraj и J. Mandal [27] наблюдалась более высокая частота переноса элементов SXT в культурах, подвергшихся воздействию ципрофлоксацина, а также азитромицина и тетрациклина, за счёт активации SOS-ответа у *V. cholerae*.

Различия в эффективности образования трансконъюгантов в присутствии АБП могут иметь различные причины. Индуцированный антибиотиками стресс может вызывать клеточные реакции, такие как изменения клеточной стенки или изменения в регуляции экспрессии генов, что увеличивает эффективность переноса генов [24, 28]. Антибиотики также могут оказывать сильное

влияние на размер и форму клеток, на архитектуру биоплёнки, на динамику популяции и сборку сообщества [29]. По-видимому, частота конъюгации и воздействие на неё антибиотиков зависят от видовой принадлежности микроорганизмов, их соотношения и конкурентных взаимоотношений, от субстрата, на котором формируется биоплёнка.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о влиянии температуры и биоплёнокообразования на передачу генов антибиотикорезистентности у холерных вибрионов. В условиях сложной биоплёнки, по сравнению с планктонной формой, происходит повышение эффективности процессов конъюгации между холерными вибрионами и другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, более выраженное на биотическом субстрате (хитине). При этом интенсивность генетического обмена тем выше, чем выше температура культивирования. Это может способствовать не только распространению ICE-элемента, но и появлению клонов бактерий с различными типами ICE в случае захвата ими и переноса соседних участков генома или, наоборот, утратой генов, а также в случае экспрессии генов, функции которых пока ещё не известны. Подтверждением этому является постоянное обнаружение новых типов ICE, которых к настоящему времени во всём мире выявлено более 35 [30].

Литература/References

- Рыбальченко Д. А., Щелканова Е. Ю., Лозовский Ю. В., Федоров А. В., Смирнова Н. И. Распространенность разных типов интегративного конъюгативного элемента SXT/R391, кодирующего множественную резистентность к антибиотикам, среди клинических штаммов возбудителя холеры. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 1: 137–147. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-137-147>. [Rybalchenko D. A., Shchelkanova E. Y. u., Lozovsky Yu. V., Fedorov A. V., Smirnova N. I. Prevalence of different types of integrative conjugative element SXT/R391 encoding multiple antibiotic resistance among clinical strains of cholera agent. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. 2022; (1): 137–147. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-137-147> (in Russian)]
- Corrado N., Burrus V. The dualistic nature of integrative and conjugative elements. *Annu Rev Genet* 2015; 21: 98–102. doi: 10.1080/2159256X.2015.1102796
- Bioteau A., Durand R., Burrus V. Redefinition and unification of the SXT/R391 family of integrative and conjugative elements. *Applied Environmen Microbiology*. 2018; 84: 13. doi: 10.1128/AEM.00485-18.
- Lu J., Wang Y., Jin M., Yuan Z., Bond P., Guo J. Both silver ions and silver nanoparticles facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes. *Water Res.* 2020; 169: 115229. doi: 10.1016/j.watres.2019.115229.
- Chen X., Yin H., Li G., Wang W., Wong P. K., Zhao H., An T. Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: Implications from oxidative stress and gene expression. *Water Res.* 2019; 149: 282–291. doi: 10.1016/j.watres.2018.11.019.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2013; 4: 375. doi: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- Harriott M. M., Noverr M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (9): 3914–3922. doi: 10.1128/AAC.00657-09.
- Król J. E., Wojtowicz A. J., Rogers L. M., Heuer H., Smalla K., Krone S. M., Top E. M. Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid.* 2013; 70 (1): 110–119. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.03.003.
- Lopatkin A. J., Huang S., Smith R. P., Srimani J. K., Syssoeva T. A., Bewick S., Karig D. K., You L. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol.* 2016; 1: 16044. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.44
- Dahmane N., Robert E., Deschamps J., Meylheuc T., Delorme C., Briandet R., Leblond-Bourget N., Guédon E., Payot S. Impact of cell surface molecules on conjugative transfer of the integrative and conjugative element ICeSt3 of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 84 (5): e02109–17. doi: 10.1128/AEM.02109-17.
- Huang H., Chen Y., Zheng X., Su Y., Wan R., Yang S. Distribution of tetracycline resistance genes in anaerobic treatment of waste sludge: The role of pH in regulating tetracycline resistant bacteria and horizontal gene transfer. *Bioresour Technol.* 2016; 218: 1284–1289. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.097.
- Nohejl T., Valcek A., Papousek I., Palkovicova J., Wailan A. M., Pratova H., Minoia M., Dolejska M. Genomic analysis of qnr-harboring IncX plasmids and their transferability within different hosts under induced stress. *BMC Microbiol.* 2022; 22 (1): 136. doi: 10.1186/s12866-022-02546-6.
- Селянская Н. А., Водопьянов С. О., Рыкова В. А., Соколова Е. П. Трансмиссивная антибиотикостойчивость, обусловленная SXT-элементом, у холерных вибрионов, выделенных на территории России. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 3: 258–264. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-8>. [Selyanskaya N. A., Vodopyanov S. O., Rykova V. A., Sokolova E. P. Transmissible antibiotic resistance, associated with the SXT element, in cholera vibrios isolated in the territory of Russia. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2020; (3): 258–264. (in Russian)]
- Селянская Н. А., Меньшикова Е. А., Курбатова Е. М., Головин С. Н. Оценка эффективности антибиотиков в отношении *Vibrio cholerae* в условиях формирования сложной биоплёнки. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (3–4): 12–15. doi: 10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-12-15. [Selyanskaya N. A., Menshikova E. A., Kurbatova E. M., Golovin S. N. Evaluation of antibiotics effectiveness against *Vibrio cholerae* under the conditions of complex biofilm formation. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2020; 65 (3–4): 12–15. doi: 10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-12-15. (in Russian)]
- Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Метод. указ. МВК 4.2.2495-09. М.: 2009; 59. Identification of the pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to antibacterial medicines. Method. the Decree. MU 4.2.2495-09. Moscow; 2009; 59. (in Russian)]

16. Методы лабораторной диагностики холеры. Метод. указ. МУК 4.2.3745-22. М.: 2022:24. Methods of laboratory diagnosis of cholera. Method. the Decree. МУ4.2.3745-22. Moscow: 2022; 24. (in Russian)]
17. Водопьянов А. С., Водопьянов С. О., Олейников И. П., Мишанькин Б. Н., Кругликов В. Д., Архангельская И. В., Зубкова Д. А., Ежова Т. Н. ИИ. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. Здоровье населения и среда обитания. 2015; 5 (266): 41–44. [Vodopyanov A. S., Vodopyanov S. O., Oleynikov I. P., Mishan'kin B. N., Kruglikov V. D., Arkhangelskaya I. V., Zubkova D. A., Yezhova T. N. INDEL- и VNTR-typing *Vibrio cholerae* strains, isolated in 2013 from the environment objects in the Russian Federation. Public Health and Life Environment. 2015; 5 (266): 41–44. (in Russian)]
18. Титова С. В., Меньшикова Е. А., Водопьянов С. О., Олейников И. П., Бородин Т. Н. Изучение биопленочной формы холерных вибрионов методом ПЦР-РВ. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2022; 27 (1): 23–32. doi: <https://doi.org/10.17816/EID109894>. [Titova S. V., Menshikova E. A., Vodopyanov S. O., Oleynikov I. P., Borodina T. N. Study of the biofilm form of *Vibrio cholerae* by RT-PCR. Epidemiology and Infectious Diseases. 2022; 27 (1): 23–32. doi: <https://doi.org/10.17816/EID109894>. (in Russian)]
19. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M. M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants. J Microbiol Methods. 2012; 88 (1): 98–102. doi: [10.1016/j.mimet.2011.10.017](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.10.017).
20. Крицкий А. А., Челдышова Л. Б., Заднова С. П., Плеханов Н. А., Смирнова Н. И. Способ одновременного выявления штаммов *Vibrio cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в режиме реального времени. Биотехнология. 2018; 34 (2): 70–72. doi: [10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79](https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79). [Kritskii A. A., Cheldyshova L. B., Zadnova S. P., Plekhanov N. A., Smirnova N. I. A method for simultaneous detection of *Vibrio cholerae* strains and drug resistance genes in their genome by means of real-time PCR. Biotechnologiya. 2018; 34 (2): 70–72. doi: [10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79](https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79). (in Russian)]
21. Harriott M. M., Noverr M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (9): 3914–3922. doi: [10.1128/AAC.00657-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00657-09).
22. Марков Е. Ю., Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Вишняков В. С., Балахонов С. В. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae*. Обзор. Биохимия. 2015; 80 (9): 1334–1343. [Markov E. Y., Kulikalova E. S., Urbanovich L. Y., Balakhonov S. V., Vishnyakov V. S. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. Biochemistry (Moscow). 2015; 80 (9): 1109–1116. (in Russian)]
23. Pallares-Vega R., Macedo G., Brouwer M. S. M., Leal L. H., Maas P., Loosdrecht M. C. M., Weissbrodt D. G., Heederik D., Mevius D., Schmitt H. Temperature and Nutrient Limitations Decrease Transfer of Conjugative IncP-1 Plasmid pJK5 to Wild *Escherichia coli*. Front microbiol. 2021; 12: 656250. doi: [10.3389/fmicb.2021.656250](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656250).
24. Ma H., Bryers J. D. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97 (1): 317–328. doi: [10.1007/s00253-012-4179-9](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4179-9).
25. Beaber J. W., Hochhut B., Waldor M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature. 2004; 427 (6969): 72–74. doi: [10.1038/nature02241](https://doi.org/10.1038/nature02241).
26. Poulin-Laprade D., Burrus V. A λ cro-like repressor is essential for the induction of conjugative transfer of SXT/R391 elements in response to DNA damage. J. Bacteriol. 2015; 197 (24): 3822–3833. doi: [10.1128/JB.00638-15](https://doi.org/10.1128/JB.00638-15).
27. Mohanraj R. S., Mandal J. Azithromycin can induce SOS response and horizontal gene transfer of SXT element in *Vibrio cholerae*. Mol Biol Rep. 2022; 49 (6): 4737–4748. doi: [10.1007/s11033-022-07323-2](https://doi.org/10.1007/s11033-022-07323-2).
28. Schuurmans J. M., Hijum S. A. F. T., Piet J. R., Handel N., Smelt J., Brul S., ter Kuile B. H. Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains. Plasmid. 2014; 72: 1–8. doi: [10.1016/j.plasmid.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.01.002).
29. Díaz-Pascual E., Hartmann R., Lempp M., Vidakovic L., Song B., Jeckel H., Thormann K. M., Yildiz F. H., Dunkel J., Link H., Nadel C. D., Drescher K. Breakdown of *Vibrio cholerae* biofilm architecture induced by antibiotics disrupts community barrier function. Nat Microbiol. 2019; 4 (12): 2136–2145. doi: [10.1038/s41564-019-0579-2](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0579-2).
30. Захарова И. Б., Викторов Д. В. Интегративные конъюгативные элементы микроорганизмов (ICES). Молекулярная генетика. 2015; 33 (3): 9–16. [Zakharova I. B., Viktorov D. V. Integrative Conjugative Elements (ICES) of microorganisms. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2015; 30 (3): 114–123. (in Russian)]

Поступила / Received 22.01.2023

Принята в печать / Accepted 25.12.2024

Информация об авторах

Селянская Надежда Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0008-4705. eLibrary SPIN: 7920-3340

Титова Светлана Викторовна — к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: 0000-0002-7831-841X. eLibrary SPIN: 5695-2103

Меньшикова Елена Аркадьевна — к. б. н., старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6003-4283

Водопьянов Сергей Олегович — д. м. н., ведущий научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4336-0439

Кругликов Владимир Дмитриевич — д. м. н., главный научный сотрудник, начальник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6540-2778

About the authors

Nadezhda A. Selyanskaya — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher of the Department of Microbiology of Cholera and Other Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0008-4705. eLibrary SPIN: 7920-3340

Svetlana V. Titova — Ph. D. in Medicine, Leading Researcher of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: 0000-0002-7831-841X. eLibrary SPIN: 5695-2103

Elena A. Menshikova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher of the Department of Microbiology of Cholera and Other Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6003-4283

Sergey O. Vodopyanov — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher of the Department of Microbiology of Cholera and Other Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4336-0439

Vladimir D. Kruglikov — D. Sc. in Medicine, Chief Researcher, Head of the Department of Microbiology of Cholera and Other Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6540-2778