

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Еникеев Радмир

**Антибиотикорезистентность бактерий рода *Bacillus*, выделенных из
Международной космической станции и больничной лаборатории**

1.5.11. Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, доцент
Захарчук Леонид Михайлович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
Глава 1. Характеристика МКС и микробного сообщества станции.....	12
1.1. Общая характеристика МКС	12
1.2. Факторы космического полета	12
1.2.1. Космическое излучение (ионизирующее излучение).....	12
1.2.2. Невесомость (микрогравитация)	13
1.2.3. Барометрическое давление.....	13
1.2.4. Повышенное содержание углекислоты	13
1.2.5. Температура.....	14
1.3. Влияние космического излучения на микроорганизмы.....	14
1.4. Влияние микрогравитации на микроорганизмы.....	16
1.5. Иммуитет в условиях космического полёта	17
1.6. Основные источники и пути формирования микробного сообщества МКС.....	17
1.7. Характеристика микробиома МКС	19
1.8. Бактерии рода <i>Bacillus</i> на МКС	23
Глава 2. Характеристика микробного сообщества больничных учреждений.....	26
2.1. Внутрибольничные бактериальные инфекции	26
2.2. Догоспитальный этап	26
2.3. Госпитальный этап	28
Глава 3. Устойчивость бактерий к антибиотикам	29
3.1. Масштабы проблемы.....	29
3.2. Основные понятия и термины	30
3.3. Основные методы определения резистентности к антибиотикам	31
3.3.1. Метод последовательных (серийных) разведений	31
3.3.2. Дisko-диффузионный метод.....	32
3.3.3. E-test	32
3.3.4. Автоматизированные системы	33
3.4. Новая классификация стратегий выживания бактерий при контакте с антибиотиками	34
3.5. Механизмы саморезистентности в организмах-продуцентах антибиотиков	38
3.5.1. Модификация антибиотиков.....	38
3.5.2. Дeгpадация антибиотиков	40
3.5.3. Системы оттока (эффлюкс).....	40

3.5.4. Модификация мишени.....	42
3.5.5. Смена мишени	42
3.6. Происхождение устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов	42
3.7. Развитие устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов.....	44
3.8. Роль горизонтального переноса генов в передаче устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов	44
3.9. Механизмы устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов.....	45
3.9.1. Ферментативная модификация и дезинтеграция антибиотиков	46
3.9.2. β -Лактамамазы бактерий	47
3.9.2.1. β -Лактамазы грамположительных бактерий	49
3.9.2.2. β -Лактамазы грамотрицательных бактерий.....	50
3.9.3. Система оттока (эффлюкс).....	50
3.9.4. Модификация мишени.....	52
3.9.5. Изменение проницаемость мембран	54
3.9.6. Метаболические шунты.....	55
Глава 4. Генетические детерминанты резистентности к антибиотикам у бацилл	55
4.1. Гены, кодирующие механизмы эффлюкса	55
4.2. Гены, кодирующие инактивацию антибиотиков	59
4.3. Гены, кодирующие защиту мишени действия антибиотиков	66
4.4. Гены, кодирующие модификацию мишени действия антибиотика	67
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	69
Глава 5. Объекты и методы исследований	69
5.1. Объекты исследований.....	69
5.2. Выделение первичных изолятов бактерий с РС МКС	70
5.3. Выделение первичных изолятов бактерий из больничной лаборатории	70
5.4. Получение чистых культур бактерий с РС МКС и больничной лаборатории.....	71
5.5. Определение чистоты культур бактерий	71
5.6. Окраска клеток по Граму	71
5.7. Определение подвижности клеток	71
5.8. Определение морфологии клеток	71
5.9. Определение размеров клеток	72
5.10. Определение наличия эндоспор в клетках	72
5.11. Определение морфологии эндоспор в клетках	72
5.12. Определение наличия в клетках параспоральных телец	73
5.13. Определение отношения бактерий к кислороду.....	73

5.14. Тест на каталазу	73
5.15. Образование бактериями кислоты из глюкозы.....	73
5.16. Идентификация культур бактерий анализом 16S рРНК	74
5.17. Идентификация культур бактерий методом MALDI-TOF MS.....	75
5.18. Полногеномное секвенирование бактерий.....	76
5.19. Оценка чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом.....	76
5.20. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом разведений в жидкой питательной среде	77
5.21. Определение активности эффлюкс-систем	78
5.22. Определение активности металло-β-лактамаз	79
5.23. Определение генов клинически значимых лактамаз.....	79
5.24. УФ-облучение эндоспор штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i>	79
5.25. Математическая обработка результатов.....	79
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	80
Глава 6. Бактерии на борту РС МКС и в больничной лаборатории	80
6.1. Бактериальная обсемененность поверхностей оборудования РС МКС.....	80
6.2. Получение и характеристика первичных изолятов бактерий с РС МКС.....	82
6.3. Общее количество бактерий на поверхностях оборудования РС МКС	86
6.4. Бактерии рода <i>Bacillus</i> на поверхностях оборудования РС МКС.....	88
6.5. Общее количество бактерий на поверхностях оборудования больничной лаборатории.....	91
6.6. Получение и характеристика первичных изолятов бактерий из больничной лаборатории.....	92
6.7. Бактерий рода <i>Bacillus</i> на поверхностях оборудования больничной лаборатории.....	95
6.8. Идентификация штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> , полученных с РС МКС и больничной лаборатории	96
6.8.1. Идентификация штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> , полученных с РС МКС..	96
6.8.2. Идентификация штаммов бактерий, полученных из больничной лаборатории.....	102
6.9. УФ-облучение эндоспор <i>B. licheniformis</i>	103
Глава 7. Определение устойчивости штаммов бацилл, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, к антибиотикам	107
7.1. Определение устойчивости штаммов бацилл, выделенных с РС МКС и	

больничной лаборатории, к пенициллинам и цефалоспорином	107
7.1.1. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков у штаммов с РС МКС и больничной лаборатории	108
7.1.2. Активность эффлюкс-насосов у штаммов <i>Bacillus</i> с РС МКС	110
7.1.3. Активность эффлюкс-насосов у штаммов <i>Bacillus</i> из больничной лаборатории	110
7.1.4. Наличие β -лактамазу штаммов <i>Bacillus</i> из больничной лаборатории	112
7.2. Определение резистентности бацилл с РС МКС и больничной лаборатории к антибиотикам, рекомендованным EUCAST	115
7.2.1. Антибиотики, рекомендованные EUCAST	115
7.2.2. Штаммы бацилл, исследованные на чувствительность к антибиотикам, рекомендованным EUCAST	117
7.2.3. Определение чувствительности к антибиотикам, рекомендованным EUCAST	117
7.2.4. Полногеномное секвенирование и наличие генов резистентности	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Рабочие поверхности и воздушные пространства обитаемых помещений на Земле характеризуются микробными сообществами, состоящими из различных видов бактерий и грибов. С помощью влажной уборки и естественной вентиляции в жилых и рабочих помещениях количество микроорганизмов снижают, хотя оно остается достаточно высоким. Однако во многих асептических помещениях, например, родильных отделениях, операционных, цехах для производства медицинских препаратов и других, количество микроорганизмов на поверхностях оборудования и в воздухе поддерживают на минимальном уровне уже с помощью воздушных фильтров, дезрастворов, УФ-излучения. Лабораторные комнаты для отбора проб крови в больницах являются одним из видов таких асептических помещений. Микроорганизмы в лабораторных комнатах уничтожаются воздействием УФ-излучения и дезинфицирующих средств, обладающих мутагенным действием. Выжившие после такой антисептической обработки микроорганизмы часто оказываются устойчивыми к лекарственным препаратам, что может быть связано еще и с тем, что пациенты лечебных учреждений часто подвергаются бесконтрольному лечению различными антибиотиками (Nikaido, 2009; Freedberg et al., 2016).

Другим видом асептических помещений является российский сегмент Международной космической станции (РС МКС), который представляет собой закрытую искусственную среду в космосе с собственной экологической нишей, характеризующейся несколькими уникальными для микроорганизмов параметрами, такими как радиация, изолированность и микрогравитация (Quagliariello et al., 2022). При этом, в отличие от наземных асептических помещений, например лаборатории для отбора анализов крови, на РС МКС длительное время сохраняется постоянный экипаж и формируется устойчивая микробиота из-за отсутствия постоянного притока новых штаммов микроорганизмов. Кроме того, в герметичной МКС, которая насыщена сложнейшим оборудованием и где работает экипаж, не применяются некоторые традиционные на Земле методы борьбы с микроорганизмами – УФ-облучение, ядовитые дезинфицирующие растворы, газы (Novikova et al., 2006). Грибы и бактерии, обитающие на борту МКС, могут нарушать работу систем жизнеобеспечения, представлять опасность для здоровья космонавтов и вызывать коррозию оборудования, поэтому на пилотируемых космических аппаратах большое внимание уделяется постоянному мониторингу состава микробных сообществ (Mora et al., 2016). Установлено, что на МКС одной из самых распространенных групп микроорганизмов являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Некоторые виды этого рода способны вызывать такие заболевания, как пищевые отравления, диарея, эндокардит, менингит, сепсис и другие формы

генерализованной бактериальной инфекции (Ehling-Schulz et al., 2019; Furuta et al., 2022). Однако информации о клинических характеристиках бактерий рода *Bacillus*, обитающих в асептических помещениях, в частности, их устойчивости к антибиотикам, еще очень мало и она носит противоречивый характер. Так, есть основания считать, что в условиях МКС бактерии могут приобретать повышенную устойчивость к антибиотикам в результате воздействия микрогравитации, космического излучения, образования биопленок, горизонтального переноса генов (Hall, Mah, 2017). Однако есть данные и об отсутствии на МКС резистентных к антибиотикам бактерий по сравнению с искусственной замкнутой средой на Земле (Mora et al., 2019). Поэтому изучение резистентности к антибиотикам у штаммов бацилл из асептических помещений, а также механизмов, генетических детерминант и возможностей распространения антибиотикоустойчивости в микробиомах этих помещений является актуальной задачей, направленной на обеспечение выбора адекватных методов лечения заболеваний, вызываемых обитающими в них бактериями рода *Bacillus*. Это особенно важно в условиях МКС, где медицинская помощь ограничена.

Цель и задачи работы.

Целью работы было выделение с рабочих поверхностей РС МКС и лаборатории для отбора проб крови изолятов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, определение устойчивости к ряду клинически значимых антибиотиков, а также выявление возможных механизмов и генетических детерминант этой резистентности.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Выявить доминирующие на поверхностях оборудования РС МКС и больничной лаборатории виды бактерий рода *Bacillus*.
2. Получить чистые культуры этих бактерий и идентифицировать их с помощью анализа гена 16S рРНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования.
3. Создать и поддерживать коллекцию штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб РС МКС и больничной лаборатории.
4. Исследовать устойчивость выделенных с РС МКС и из больничной лаборатории штаммов бактерий рода *Bacillus* к 19 клинически значимых антибиотикам, в том числе к 9 антибиотикам – имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, линезолиду, рекомендованным Европейским комитетом по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам (EUCAST, 2021-2023).
5. Определить у резистентных к антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus* возможные механизмы устойчивости к этим антибиотикам.

6. Выявить генетические детерминанты резистентности к антибиотикам у устойчивых к антибиотикам штаммов бацилл на основе полногеномного секвенирования резистентных штаммов.

7. Определить потенциальную возможность распространения резистентности к исследованным антибиотикам в бактериальных сообществах РС МКС и больничной лаборатории.

Научная новизна работы.

Показано, что на поверхностях оборудования таких асептических помещений, как РС МКС и больничная лаборатория, присутствуют штаммы, принадлежащие всего к нескольким видам рода *Bacillus* – *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*. При этом из 26 выделенных из РС МКС штаммов бацилл 6 штаммов принадлежали к виду *B. paralicheniformis*, принадлежность к которому удалось установить только с помощью полногеномного секвенирования.

Изучена резистентность штаммов бацилл с РС МКС и больничной лаборатории к 19 клинически значимым антибиотикам. Установлена устойчивость выделенных штаммов к 18 из 19 исследованных антибиотиков, в зависимости от штамма. **Впервые** определена резистентность бацилл, выделенных с РС МКС, к 9 антибиотикам – имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, линезолиду, рекомендованным EUCAST 2021-2023 для подавления роста бацилл. Установлена устойчивость выделенных штаммов к 18 из 19 исследованных антибиотиков – пенициллину, ампициллину, цефазолину, цефуроксиму, цефтриаксону, цефоперазону, цефтазидиму, цефепиму, спектиномицину, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину и линезолиду.

Показано, что многие штаммы бацилл, выделенные с РС МКС и больничной лаборатории, в том числе условно-патогенные *B. cereus* LR2HG21, *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) – резистентностью к нескольким структурно и функционально не родственными антибиотикам, таким как β-лактамы, фторхинолоны, оксазолидиноны, аминогликозидам.

Установлено, что резистентность *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 и *B. safensis* SE192 к пенициллину, ампициллину, имипенему, меропенему, цефуроксиму, цефтриаксону, цефоперазону, цефтазидиму, цефепиму и спектиномицину, в зависимости от штамма, может обеспечивать система эффлюкс-насосов, функционирующих за счет электрохимического потенциала клеточной мембраны и гены *TEM-116*, *VcI*, *VcII*, *APH(3')-IIa*, кодирующие соответственно β-лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС), сериновую β-лактамазу I, β-лактамазу II и аминогликозид-3'-О-фосфотрансферазу.

Резистентность к эритромицину и (или) клиндамицину *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183, *B. cereus* SE43, *B. subtilis* SE15, SE171, в зависимости от штамма, обеспечивает ген *ermD*, кодирующий эритромицин-резистентную метилазу, а также гены *mphL* и *mphK*, кодирующие макролидные фосфотрансферазы (Mphs).

Теоретическая и практическая значимость работы

Создана коллекция из 31 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больничной лаборатории и идентифицированных путем исследования их морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков, анализа гена 16S рРНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования.

Результаты определения резистентности штаммов бацилл, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больничной лаборатории, к 19 клинически значимым антибиотикам, действующим на штаммы бактерий рода *Bacillus*, в том числе к 9 антибиотикам – имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, линезолиду, рекомендованным EUCAST в качестве препаратов для подавления роста бацилл (EUCAST 2021-2023), позволяет рекомендовать некоторые антибиотики из этого ряда, устойчивость бацилл к которым отсутствует, для лечения возможных вспышек инфекций, вызываемых штаммами бацилл на борту РС МКС.

Обнаружение на борту РС МКС и в больничной лаборатории штаммов бацилл, обладающих высокой устойчивостью в отношении многих антибиотиков, установление множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у некоторых из этих штаммов, а также потенциальной возможности распространения механизмов резистентности в результате горизонтального переноса генов, как это может быть в случае с генами *TEM-116*, *BcI* и *BcII*, свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга асептических помещений, особенно РС МКС, с целью своевременного предупреждения возможных потенциальных рисков, которые могут представлять некоторые из штаммов бацилл для здоровья людей с ослабленным иммунитетом – например, космонавтов в результате их работы в экстремальных условиях длительного космического полета.

Результаты исследований могут быть использованы при чтении курса лекций «Медицинская микробиология», проводимых для студентов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ.

Методология и методы исследования

Основой методологии в диссертационной работе являлось использование современных методов микробиологии, физиологии и биохимии микроорганизмов, молекулярной биологии и статистики, необходимых для обработки результатов исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. На поверхностях оборудования РС МКС и больничной лаборатории в большом количестве присутствуют бактерии нескольких видов рода *Bacillus*.

2. Штаммы бацилл, выделенные с РС МКС и больничной лаборатории, устойчивы ко многим клинически значимым антибиотикам. Некоторые штаммы бацилл, в том числе условно-патогенного вида *B. cereus*, обладают множественной лекарственной устойчивостью.

3. Резистентность к антибиотикам у бацилл с РС МКС и медицинской лаборатории обеспечивается одним или одновременно несколькими механизмами защиты, такими как инактивация антибиотика, изменение мишени, эффлюкс.

4. Гены устойчивости к антибиотикам у бацилл с РС МКС и медицинской лаборатории закодированы в хромосомах и/или плазмидах.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность результатов диссертационной работы Еникеева Р. обеспечена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований с использованием современных методов исследования, рекомендованных российским и международным научным сообществом. Основные положения и результаты научно-квалификационной работы были представлены и обсуждены на конференциях разного уровня, посвященных проблемам микробиологии и медицины:

- 2-й Российский микробиологический конгресс в Саранске, 2019.

- Всероссийская конференция с международным участием "Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии" в Москве, 2019.

- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020».

- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021».

Эти работы подтверждают вклад исследователя в развитие научного понимания устойчивости к антибиотикам у штаммов бактерий рода *Bacillus*, обитающих в уникальных условиях асептических помещений, таких как Международная космическая станция, а также в более традиционных медицинских контекстах, подчеркивая значимость и актуальность выполненной работы.

Структура работы

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и включает 22 рисунков и 17 таблиц. Работа состоит из введения, 7 глав (обзор литературы, ма-

териалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованной литературы, содержащего 245 наименований.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 печатные работы, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в сборе и анализе литературных источников по теме исследования, определении цели работы, осуществлении выбора путей решения задач, выполнении экспериментальных исследований, включая изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий, анализ гена 16S рРНК, MALDI-TOF, изучение резистентности штаммов к разным антибиотикам, определение механизмов устойчивости, установление генетических детерминант устойчивости с использованием базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), в статистическом анализе полученных результатов, подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за неоценимую помощь, всестороннюю поддержку и ценные советы при выполнении работы: научному руководителю, д.б.н., доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ Леониду Михайловичу Захарчуку, член-корр. РАН, д.б.н., профессору Елизавете Александровне Бонч-Осмоловской, к.б.н., доц. Наталье Юрьевне Татариновой, к.б.н., ст. н. с. Елизавете Николаевне Виноградовой. Особая благодарность к.б.н., в.н.с. Татьяне Анатольевне Алеховой за предоставление проб с РС МКС.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Характеристика МКС и микробного сообщества станции

1.1. Общая характеристика МКС

Международная космическая станция (МКС) — это пилотируемая орбитальная станция, используемая как многоцелевой космический исследовательский комплекс. Она функционирует на орбите с 20 ноября 1998 года по настоящее время.

МКС является крупнейшей пилотируемой космической платформой на низкой околоземной орбите (~ 400 км над поверхностью Земли) и представляет собой герметично закрытую систему, подверженную воздействию микрогравитации, космического излучения (радиации), повышенного содержания CO₂ и рециркуляции воздуха через фильтры HEPA и считается “экстремальной средой” (Yamaguchi et al., 2014; Checinska et al., 2015). В течение последних 26 лет на ней постоянно обитает международное сообщество астронавтов и космонавтов, занимающихся космическими исследованиями. МКС, представляющая собой закрытое пространство, характеризуется собственной экосистемой, сформированной микроорганизмами и людьми.

1.2. Факторы космического полета

1.2.1. Космическое излучение (ионизирующее излучение)

На высоте орбиты 350-400 км МКС находится над магнитосферой Земли. Это приводит к тому, что космонавты подвергаются действию более высоких доз ионизирующего излучения (Checinska-Sielaff et al., 2019). Основными источниками излучения являются галактические космические лучи (энергетические частицы из-за пределов нашей Солнечной системы), частицы, захваченные магнитным полем Земли (радиационный пояс/пояс Ван Аллена), и энергетические частицы, образованные вспышками на Солнце. Высокоэнергетические протоны и тяжелые ионы исходят от Солнца и других частей космоса. Космическая радиация в результате проникновения в вещество отщепляет от атомов электроны с образованием положительных и отрицательных ионов, поэтому космическое излучение является ионизирующим излучением. Клетки и ткани живых организмов повреждаются при действии космического излучения в результате образования ионов, нарушающих биохимические реакции клеток. Космическое излучение на 75% состоит из ядер водорода (протонов) остальные 25% составляют ядра гелия (альфа-частицы).

Средняя суммарная доза радиации, которую человек на Земле получает от естественных наземных источников и медицинских процедур, составляет менее 0,005 Зиверта (Зв) в год. Стандартная доза облучения, связанная с рентгенограммой грудной клетки, составляет 0,02 мкЗв. На орбитальных высотах, близких к высоте МКС, эквивалентная доза для космонавтов составляет около 0,3 Зв в год (Horneck et al., 2010). МКС получает свет и

тепло от Солнца, при этом до станции доходят и коротковолновые излучения Солнца – ультрафиолетовое и корпускулярное. Большая часть этого УФ-излучения с длиной волны от 10 до 300 миллимикрон не может проникать через иллюминаторы МКС и поэтому не опасна для живых организмов. Однако УФ-излучение в условиях космического вакуума может повреждать материала кабины и оборудование МКС. От Солнца к МКС поступают и лучи с длиной волны менее 10 миллимикрон, представляющие корпускулярное излучение Солнца. Эта корпускулярная радиация опасна способностью образовывать озон и повреждать материалы космических скафандров (Quagliariello et al. 2022).

Влияние на человека ионизирующего излучения, особенно космической радиации, изучено недостаточно. Для обеспечения безопасности длительных космических полетов необходимо изучить влияние космической радиации сначала на простейшие живые организмы (бактерии, дрожжи), растения, насекомые и животные (Кудряшов, 2004).

1.2.2. Невесомость (микрогравитация)

Изменения минеральной плотности костной ткани, мышечной массы и работы мышц являются наиболее изученными физиологическими эффектами микрогравитации, связанной с космическими путешествиями человека. Потеря минеральной плотности костной ткани в условиях микрогравитации хорошо задокументирована. Серьезные последствия потери минеральной плотности костей (например, переломы и образование камней в почках), способны осложнить длительное пребывание на космической станции.

Невесомость, естественно, является значительным физиологическим стрессом для всех обитателей космического корабля, в том числе микроорганизмов. В связи с этим изучение влияния невесомости на живые организмы является важной составляющей освоения длительных космических полетов (Vico et al., 2000; Checinska-Sielaff et al., 2019).

1.2.3. Барометрическое давление

В земных условиях человек и животные находятся на уровне моря при атмосферном давлении, равном 1 кг/см^2 (760 мм). Российский скафандр «Орлан» находится под давлением 40 кПа. Переход от атмосферного давления к вакууму при разгерметизации шлюза вызывает у космонавтов, выходящих в открытый космос, значительный декомпрессионный стресс. Так, перед выходом в открытый космос астронавты выполняют протокол предварительного дыхания кислородом, снижающий уровень азота в тканях. Астронавтов учат распознавать симптомы декомпрессионной болезни (Thirsk et al., 2009).

1.2.4. Повышенное содержание углекислоты

В соответствии с требованиями ГОСТ 30494-2011 нормой содержания CO_2 в жилых помещениях является 800 ppm. (около 0,08%) при этом допускается повышение концентрации CO_2 до 1000-1400 ppm. в течение нескольких часов. При предельной концентрации

CO₂ в воздухе на уровне 0,5% (5000 ppm) человек может находиться не более 8 часов. В условиях МКС требования НАСА позволяют содержание CO₂ в воздухе станции до 0,08% (800 ppm). Однако в реальности НАСА старается держать на МКС уровень не выше 500 ppm. (0,05%) (ISSMORD. 2005). Смертельным считается содержание углекислоты в воздухе 1,5 % (15000 ppm). Следует отметить, что патогенные бактерии для роста требуют повышенного содержания CO₂ (до 5%) в газовой фазе (Зверев, Бойченко, 2019).

1.2.5. Температура

Температура на МКС поддерживается на уровне от 23 до 28°C, влажность 70%. На Земле тепло передается по воздуху посредством теплопроводности или конвекции, но, в космосе отсутствует воздух, таким образом единственным способом передачи тепла является излучение (Quagliariello et al., 2022).

Находясь на орбите, МКС испытывает широкий диапазон температур. Поскольку она постоянно вращается вокруг планеты, то иногда находится над освещенной солнцем стороне Земли, а иногда над темной стороной. Когда МКС обращена к солнцу, температура внешней стороны составляет около +120°C, а когда станция находится со стороны нашей планеты, которая полностью загораживает солнце, температура падает до -157°C.

Исходя из того, что на МКС происходит примерно 16 восходов и 16 закатов за одни сутки, можно представить какие резкие перепады температуры испытывает корпус МКС. Для того, чтобы тепловое излучение не повышало внутреннюю температуру станции, корпус покрыт «одеялом» с высокой отражающей способностью, называемым «многослойной изоляцией». Этот отражающий слой не только задерживает солнечную радиацию, но и защищает МКС от низких температур космоса (Thirsk et al., 2009).

Избыточное тепло, вырабатываемое на борту МКС, взаимодействует с набором теплообменников, формирующих систему активного терморегулирования. Отработанное тепло на борту МКС удаляется двумя способами – с помощью охлаждающих пластин и теплообменников, обе системы связаны с контуром циркулирующей воды. Холодная вода проходит через теплообменные устройства и поглощает от них тепловую энергию. Поскольку теплоносущая холодная вода быстро замерзла бы при низких температурах космоса, отработанное тепло еще раз проходит через петлю, только на этот раз петля содержит жидкий аммиак вместо холодной воды. Жидкий аммиак замерзает при более низкой температуре, чем вода (-77°C), поэтому аммиак проходит через радиаторы и «сбрасывает» тепло в космос в виде инфракрасного излучения (Thirsk et al., 2009).

1.3. Влияние космического излучения на микроорганизмы

Радиация приводит к биологическим эффектам путем генерации мутаций либо путем прямого поглощения энергии биомолекулами (белками и нуклеиновыми кислотами),

либо косвенно через взаимодействие биомолекул с радиационно-индуцированными радикалами, которые генерируются различными окружающими процессами (Horneck et al., 2010; Huang et al., 2018). ДНК подвержена повреждению радиацией из-за образования двухцепочечных разрывов, которые в конечном итоге приводят к мутациям, как это наблюдается у *E. coli*, *B. subtilis* и *Deinococcus radiodurans* (Zimmermann et al., 1994). Микроорганизмы обладают несколькими механизмами репарации ДНК, либо путем гомологичной рекомбинации, либо путем негомологичного присоединения концов. Однако способность переносить радиацию зависит от степени, в которой организм может восстанавливать ДНК с помощью путей репарации ДНК; например, *D. radiodurans* примерно в 5 раз более устойчив к ионизирующему излучению, чем споры *B. subtilis*. Степень этой способности восстанавливать ДНК, в основном через негомологичное соединение концов (NHEJ), приводит к мутациям и, таким образом, отвечает за степень выживаемости микроорганизмов в присутствии космического излучения (Della et al., 2004; Gong et al., 2005; Senatore et al., 2018). Кроме космической радиации в космическом пространстве нужно учитывать прямое воздействие солнечного УФ-излучения и видимого света, которые могут приводить к образованию активных форм кислорода и вызывать повреждения нуклеиновых кислот, белков и липидов (Senatore et al., 2018; Quagliariello et al., 2022). Поглощение фотонов солнечного УФ-излучения и его возбуждение приводят к образованию бипириимидиновых повреждений в ДНК. Эти повреждения приводят к образованию циклобутан-пириимидиновых димеров и пириимидиновых фотопродуктов между соседними пириимидиновыми остатками на одной и той же цепи ДНК в вегетативных клетках (Cadet et al., 1992). Например, моноспой эндоспор различных *Bacillus* sp., подвергшихся воздействию имитируемого ультрафиолетового излучения Mars, демонстрировали различную кинетику инактивации, причем *B. pumilus* был наиболее устойчив, что указывает на различия в их способности активировать пути репарации ДНК (Newcombe et al., 2005; Schuergera et al., 2006; Quagliariello et al., 2022). Подобно бактериям, многие виды грибов и их споры обладают высокой устойчивостью к радиации. У большинства грибов основным путем, ответственным за восстановление двухцепочечных разрывов в ДНК, также является негомологичное соединение концов (NHEJ) и большинство двухцепочечных разрывов восстанавливаются без использования гомологичной последовательности ДНК, что в конечном итоге приводит к мутациям (Arentshorst et al., 2012). Интересно, что конидиальные моноспой некоторых грибов при воздействии имитируемого марсианского УФ-излучения показывают повышенную устойчивость к излучению по сравнению с эндоспорами *Bacillus* (Blachowicz et al., 2019). В другом исследовании было обнаружено, что *Aspergillus* sp. и *Penicillium* sp. доминируют среди различных видов грибов, отобранных из МКС в течение

6 лет (Novikova et al., 2006). Кроме этого, некоторые дрожжи, например, *Saccharomyces cerevisiae*, показывают крупномасштабные геномные перестройки в условиях стресса, способствующие их выживанию (Chan et al., 2007). Таким образом, воздействие космической радиации может привести к увеличению частоты мутаций в геномах многих микроорганизмов.

Условия космического излучения на Земле невозможно имитировать из-за присутствия в космосе множества излучений с разной энергией. Однако для имитации этих излучений и их воздействия на микроорганизмы были разработаны устройства с контролируемым облучением, например, ускорители тяжелых ионов и полихроматические источники ультрафиолетового излучения для имитации на Земле космических лучей и солнечного УФ-излучения, соответственно (Horneck et al., 2010).

1.4. Влияние микрогравитации на микроорганизмы

Большинство экспериментов на МКС проводятся в контролируемой среде внутри космической капсулы, представляющей собой герметичный модуль с системами жизнеобеспечения, где микроорганизмы защищены от большинства экстремальных условий в космосе, за исключением микрогравитации и космического излучения. Таким образом, различия, наблюдаемые в микробной физиологии на клеточном или генетическом уровнях, в основном объясняются влиянием микрогравитации и космической радиации, если только исследования не проводятся за пределами МКС (Senatore et al., 2018).

На основе данных, полученных в результате нескольких экспериментов, проведенных в условиях космического полета, была выдвинута гипотеза о том, что влияние микрогравитации на микробные клетки зависит от их подвижности (Benoit, Klaus, 2007). Исходя из опубликованных данных, можно сделать вывод, что влияние микрогравитации на клеточные свойства микроорганизмов, многогранно. Например, имитация микрогравитации привела к увеличению текучести мембран у *E. coli*, что может быть причиной повышения лекарственной устойчивости (Baker et al., 2004). Некоторые исследования показали влияние микрогравитации на генетическом уровне – так экспрессия около 100 генов изменилась у сальмонелл при моделировании микрогравитации. Эти изменения затронули регуляторы транскрипции, факторы вирулентности, ферменты синтеза липополисахаридов и ферменты утилизации железа (Wilson et al., 2002). Помимо этого, наличие микрогравитации влияет на рост, морфологию, лекарственную устойчивость, образование биопленок и вторичный метаболизм микроорганизмов (Van Mulders et al., 2011; Lawal et al., 2013; Zea et al., 2016). Изучение влияния микрогравитации на клеточные процессы с практической точки зрения важно по двум основным причинам. Во-первых, микроорганизмы в этих условиях могут приобретать или проявлять повышенную вирулентность или устойчивость

к лекарственным средствам, что представляет угрозу для здоровья членов экипажа, особенно в закрытой среде обитания МКС (Rosenzweig et al., 2010; Crabbe et al., 2013). Во-вторых, в условиях микрогравитации микроорганизмы способны синтезировать новые соединения или демонстрировать повышенную выработку уже известных соединений (Benoit et al., 2006; Quagliariello et al., 2022).

В космосе в условиях микрогравитации клетки могут синтезировать некоторые вторичные метаболиты в отсутствие сдвиговых сил. Так *Streptomyces plicatus* показал повышение продуктивности антибиотика актиномицина D от 296% до 577% по сравнению с земным контролем в зависимости от состава среды культивирования (Lam et al., 2002). А *Aspergillus fumigatus*, после воздействия условий космического полета, увеличил образование антибактериального соединения фумигаклавина А по сравнению с земным контрольным штаммом (Кнох et al., 2016).

1.5. Иммуитет в условиях космического полёта

После длительных полётов у космонавтов происходит снижение общей иммунологической реактивности организма, что проявляется уменьшением содержания в крови Т-лимфоцитов, снижением функциональной активности Т-хелперов и Т-киллеров, ослаблением синтеза важнейших биорегуляторов, таких как интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерферона и других, увеличением микробной обсеменённости кожных покровов и слизистых оболочек, повышением устойчивости ряда микроорганизмов к антибиотикам, появлением и усилением признаков их патогенности (Gueguinou, 2009). Значение выявленных изменений иммунологической реактивности аутомикробиоты организма космонавта, находящегося как в космическом полете, так и после него, состоит в том, что эти изменения могут способствовать повышению вероятности развития аутоиммунных заболеваний, а также заболеваний бактериальной, вирусной и аллергической природы. Показано, что патогенность (вирулентность) бактерий повышается в результате действия условий полета, а иммунный статус астронавтов за счет стресса снижается (Borchers et al., 2002; Mermel, 2013; Quagliariello et al., 2022).

1.6. Основные источники и пути формирования микробного сообщества МКС

МКС представляет собой замкнутую систему, населенную микроорганизмами, которые подвергаются воздействию уникальных условий – микрогравитации, космического излучения, повышенного содержания CO₂. Известно, что микробы выживают и даже процветают в экстремальных условиях, поэтому штаммы, присутствующие на МКС, возможно, существовали там с момента создания МКС. Кроме того, новые штаммы появляются каждый раз при прибытии на МКС очередной группы космонавтов, а также нового оборудования и материалов. На МКС микроорганизмы, имеющие земное происхождение, адап-

тируются к новым условиям обитания (Venkateswaran et al., 2014; Ichijo et al., 2016; Quagliariello et al., 2022). В результате на МКС обитает множество микроорганизмов, происходящих из грузов с Земли, компонентов экспериментов (реактивы, приборы) или являющихся представителями микробиоты членов экипажа, уже находящихся на станции или прибывающих с новой экспедицией (Castro et al., 2004; Checinska-Sielaff et al., 2019; Voorhies et al., 2019).

Еще во время работы на орбите Земли станции «Мир» (1986-2001 гг.) большое значение придавали проблеме предупреждения микробной контаминации станции, так как опасались микробных повреждений оборудования и заботились о санитарной безопасности и здоровье экипажа (Бондаренко и др. 2000). Считали, что эти процессы на станции «Мир» могут приобретать опасный характер в силу участия в них как патогенных для человека бактерий, так и микроорганизмов-биодеструкторов, способных, как свидетельствовал уже тогда опыт этой станции, очень негативно влиять на работу приборов станции и систем ее жизнеобеспечения (Новикова, 2001). К факторам, повышающим риск развития биоповреждений конструкционных материалов орбитальных станций, приводит недостаточная эффективность мероприятий по обеспечению биологической чистоты на этапах подготовки космических объектов к запуску и при осуществлении грузопотока на орбиту. С целью предупреждения микробной контаминации орбитальных станций стали применять предполетную обработку оборудования и материалов экологически приемлемыми биоцидами, отвечающими требованиям, предъявляемым к использованию в обитаемых замкнутых объектах. Это такие препараты, как грилен, катамин АБ, окадез (катамин АБ 1,7%, перекись водорода 30%, карбамид до 100%) и другие (Поддубко, 2007). Для предполетной подготовки грузов с целью удаления с их поверхности микроорганизмов была изучена принципиальная возможность применения комбинированного воздействия импульсного УФ-излучения и паров перекиси водорода. Действие этой комбинации проверялось заражением конструкционных материалов ассоциациями грибов и бактерий, размещением этих материалов внутри рабочей камеры специальной установки, дальнейшей обработкой и оценкой выживаемости тест-культур в составе специальных ассоциаций микроорганизмов (Поддубко, 2007). Но, несмотря на все усилия по предотвращению контаминации оборудования на этапе его предполетной подготовки, некоторые земные виды бактерий и грибов с каждым космическим полетом попадают на МКС. Вторым источником поступления новых штаммов микроорганизмов на МКС являются члены новых экипажей космонавтов, которые, хотя и проходят тщательную предполетную медицинскую проверку, но приносят с собой на МКС новые штаммы, поскольку эти бактерии являются частью микробиоты человеческой кожи и кишечника (Checinska-Sielaff et al., 2019). Но есть еще и

третий источник появления новых штаммов на МКС. Предполагаемой причиной появления в космосе штаммов бактерий, например, устойчивых к ряду антибиотиков, могут быть, прежде всего, мутации, вызванные предполетной стерилизацией оборудования и приборов с помощью УФ-облучения, перекиси водорода или других дезинфектантов, а также мутации, обусловленные воздействием специфических условий космоса – космическим излучением и микрогравитацией (Horneck et al., 2012). А дальше клинически значимая устойчивость к противомикробным препаратам, появившихся на МКС штаммов, может распространяться путем горизонтального переноса генов – например, с помощью плазмид (Timmerly et al., 2011; Nolivos et al., 2019). Так, у большинства из 40 штаммов бактерий, выделенных из проб исследовательской станции в Антарктике и МКС, обнаружили одну или две плазмиды, некоторые из которых были связаны с репликационными элементами вирулентности *Bacillus anthracis* pXO1 и pXO2. Кроме того, было установлено, что шесть из 25 протестированных штаммов приобрели чужеродную ДНК путем конъюгации (Timmerly et al., 2011; Nolivos et al., 2019). Одним из доминирующих родов бактерий на МКС является *Staphylococcus* (Burton et al., 2020). Известно, что стафилококки оказались первыми микроорганизмами, среди которых широкое распространение получила устойчивость к β -лактамам антибиотикам, что привело к существенному снижению эффективности традиционной терапии (Foster, 2017).

1.7. Характеристика микробиома МКС

Микробиом МКС напоминает некоторые микробиомы «закрытых помещений» на Земле – микробиомы домов (Adams et al., 2013; Lax et al., 2014; Wilkins et al., 2016), офисов, исследовательских биостанций (Hewitt et al., 2012; Gauzere et al., 2014), больниц (Bokulich et al., 2013; Brooks et al., 2014; Lax et al., 2017). Эти земные микробиомы содержат множество бактерий, грибов и вирусов, часто уникальных для таких внутренних сред. На количество и состав их микробного населения влияют такие факторы, как конструкция здания, наличие вентиляции, поток воздуха, влажность, давление, количество людей и предназначение помещения (Amend et al., 2010; Meadow et al., 2014). Было показано, что определенные микроорганизмы в таких помещениях влияют на здоровье человека, повышая восприимчивость к аллергическим реакциям и инфекционным заболеваниям (Mora et al., 2016). Как уже отмечалось, микроорганизмы, присутствующие на МКС, могут быть там с момента запуска станции и дополнительно появляться каждый раз при прибытии очередной группы космонавтов, нового оборудования и материалов. На МКС микроорганизмы, имеющие земное происхождение, адаптируются к новым условиям обитания (Venkateswaran et al., 2014; Ichijo et al., 2016). Так биопленки, формирующиеся в условиях микрогравитации, отличаются по способу образования и по своей архитектуре от биопле-

нок, образующихся на Земле (Kim et al., 2013). Показано, что патогенность (вирулентность) бактерий изменяется как в результате действия условий полета, так и за счет стресс-индуцированного снижения иммунного статуса астронавтов (Borchers et al., 2002; Mermel, 2013). Подобные изменения в отношениях бактерий с макроорганизмом (хозяином) представляют потенциальную угрозу для экипажей кораблей как из-за нарушения иммунитета, связанного с космическими полетами, так и невозможностью получения в условиях космоса сложных медицинских манипуляций, доступных только на Земле. С момента создания МКС и до сих пор рутинный микробиологический мониторинг поверхностей, воздуха и воды осуществляется НАСА и Федеральным космическим агентством России, с использованием методов, основанных на получении и изучении растущих культур (Novikova et al., 2006; Crucian, Sams, 2009; Venkateswaran et al., 2014; Checinska-Sielaff et al., 2019). Однако следует отметить, что большинство микроорганизмов со станции не могут быть выращены при стандартных земных микробиологических условиях культивирования (Staley, Конопка, 1985; Rappé, Giovannoni, 2003). По этой причине, чтобы понять истинное микробное многообразие МКС, требуются методы, отличные от культивирования в стандартных лабораторных условиях. Наиболее перспективным подходом для всестороннего анализа микробиоты МКС представляется использование высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing), анализа 16S RNA и количественной полимеразной цепной реакции (quantitative PCR (qPCR)) (McIntyre et al., 2016; Boguraev et al., 2017; Castro-Wallace et al., 2017; Lax et al., 2017). Таким образом, работа космонавтов на МКС требует более тщательного изучения микробиома такой замкнутой среды, как МКС, с целью определения типов микроорганизмов, которые могут накапливаться в этой уникальной космической среде, времени их выживания, влияния на здоровье человека и оборудование космических кораблей. Внедрение новых молекулярных методов для мониторинга микробных «космических» популяций открывает возможность для расширения существующих методов наблюдения микробиома МКС с целью сохранения здоровья экипажа. Работа по изучению микробиома МКС активно осуществляется научными коллективами США (Vaishampayan et al., 2014; Checinska et al., 2015; Coil et al., 2016; Castro-Wallace et al., 2017; Checinska-Sielaff et al., 2019), Европы (Mora et al., 2016 a,b; 2019), Японии (Ichijo et al., 2013, 2016, 2020) и некоторых других стран (Timmerly et al., 2011; Santomartino et al., 2020). NASA и Европейское космическое агентство (ESA) осуществляют мониторинг микробиома на МКС в рамках проектов Microbial Tracking Experiment 1 (MT-1) (2015 – 2017 гг.) и Microbial Tracking Experiment 2 (MT-2) с 2017 г. Задачей проектов является идентификация и каталогизация потенциально патогенных микроорганизмов. Исследование микробиома МКС проводится NASA и ESA с использованием как микро-

биологического мониторинга поверхностей, воздуха и воды с помощью методов, основанных на получении и изучении растущих культур, так и с применением молекулярно-генетических методов. Изоляты растущих культур после их идентификации с помощью молекулярных методов исследуются на устойчивость к антибиотикам, дезинфицирующим веществам, действию УФ-облучения, микрогравитации, радиации, высушивания, высоких температур. Изучается также вирулентность микробных изолятов и их возможное биоразрушающее действие на элементы внутреннего интерьера МКС (Dai et al., 2016; Knox et al., 2016; Mora et al., 2016 a, 2019). В проекте МТ-1 для характеристики разнообразия бактерий и грибов (микробиомы), населяющих МКС, использовали сравнительный анализ результатов микробиологических и молекулярных методов (Chęcinska-Sielaff et al., 2019). На основе этого анализа была создана база данных “Gene Lab”, открытая для научного сообщества. В модуле Европейского космического агентства “Columbus” также регулярно осуществляется контроль контаминации поверхностей по процедурам, схожим с используемыми NASA. Основные работы по изучению микробиома МКС ведутся в США. NASA активно внедряет молекулярные методы для изучения «космических» микроорганизмов, что приближает понимание истинного состава микробиоты, обитающей на МКС. В частности, NASA развивает аппаратную базу для автоматического выделения и секвенирования нуклеиновых кислот. Миниатюрный аппарат для амплификации ДНК был доставлен на МКС в 2016 г., где была выполнена амплификация ДНК рыбы *Cyprinidae* семейства карповых с использованием плазмиды, предварительно подготовленной на Земле. Генетический анализ был выполнен непосредственно на орбите в рамках проекта Wetlab-2. Миниатюрный ДНК-секвенатор MinI ON (Oxford Technologies), испытанный на МКС, позволил проанализировать ДНК с минимальными ошибками благодаря микрогравитации. Конечной целью этих проектов являлось проведение мониторинга и идентификации микроорганизмов непосредственно в космическом пространстве, полностью исключив доставку анализируемых образцов на Землю (Ichijo et al., 2016; 2020; Knox et al., 2016; Mc Intyre et al., 2016; Castro-Wallace et al., 2017). В результате серии этих работ непосредственно на орбите на американском сегмента МКС с помощью секвенатора MinI ON успешно осуществлена идентификация полученных на борту бактерий *Staphylococcus hominis* и *Staphylococcus capitis* (Burton et al., 2020). По рекомендации Национального исследовательского совета (NRC) НАСА создало масштабную программу микробной обсерватории на платформе американского сегмента МКС (National Research Council (U.S.), 2011). В рамках этой инициативы НАСА были изучены микробные сообщества на поверхности МКС из восьми определенных мест в течение трех полетных миссий 2015-2016 годов, продолжавшихся в течение 14 месяцев. Сообщества были охарактеризованы как с исполь-

зованием методов культивирования, так и количественной ПЦР, секвенирования ампликона гена 16S рРНК и внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) (Chęcinska-Sielaff et al., 2019). Популяция культивируемых бактерий и грибов на внутренних поверхностях американского сегмента МКС в зависимости от места отбора проб состояла из различных бактерий (филы Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria) и грибов (филы Ascomycota и Basidiomycota). В целом количество культивируемых бактерий, выделенных из 24 образцов МКС, варьировалось от $6,7 \times 10^3$ до $7,8 \times 10^{10}$ КОЕ/м² а грибов – от $1,1 \times 10^5$ до $3,1 \times 10^8$ КОЕ/м². Преобладающими родами бактерий были *Staphylococcus* (26% от общего числа идентифицированных изолятов), *Pantoea* (23%) и *Bacillus* (11%), а на уровне видов доминировали *Staphylococcus aureus* (10%), *Pantoea conspicua* (9%) и *Pantoea gaviniae* (9%). Было показано, что доминирующие организмы американского сегмента МКС связаны с микробиомом человека и могут включать условно-патогенные возбудители. Высокий процент культивируемой популяции представлен условно-патогенными микроорганизмами – *Staphylococcus aureus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *Poecilosomella conspicua*, *Acinetobacter pittii*, *Klebsiella quasipneumoniae* и *Aspergillus fumigatus*. Это может иметь потенциальные последствия для здоровья космонавтов, поскольку показано, что бактерии и микроскопические грибы передаются от поверхности к человеку при контакте (Lax et al., 2014). В целом микробиом окружающей среды американского сегмента МКС больше напоминает микробиом поверхности кожи животных и человека, чем микробиом почвы. Это может быть связано с тем, что грузы, отправляемые на космическую станцию, были тщательно обработаны, и, следовательно, связанных с почвой микроорганизмов не содержали. В ходе эксперимента EXTREMOPHILES, проведенным в 2017 г. Европейским космическим агентством, было обнаружено, что при культивировании микробного сообщества выделяются штаммы с экстремально толерантными свойствами (National Research Council (U.S.) 2011). Среди нескольких сотен изученных образцов были выявлены 76 уникальных бактериальных изолятов, которые имели различное происхождение и отличались по ростовым характеристикам. Часть штаммов показали способность сохранять ростовые свойства при воздействии ультрафиолетового излучения (*Deinococcus marmoris*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Brevibacillus agri*, UV 254 nm: 200 J/m²). Обнаружены штаммы видов *Roseomonas* sp., *Kocuria palustris*, *Micrococcus yunnanensis*, *Paenibacillus* sp., устойчивые к рентгеновским лучам (X-ray: 1000 Gy). В ходе эксперимента выделены представители видов *Pseudomonas psychrotolerans* и *Paenibacillus* sp., культивируемые при высоких и низких значениях pH и устойчивые к тепловому шоку. В качестве примеров, был выделен изолят термофильного микроорганизма *Thermaerobacter litoralis*, который не культивируется при температуре ниже +50°C (оптимальная температура – +65°C), а также

представители видов *Sphingomonas aerolata* и *Microbacterium lemovicicum*, проявившие значительную толерантность к низким температурам (выделены при +4°C). В составе микробиоты также обнаружены многочисленные грибы родов *Aspergillus species* (*A. sydowii*, *A. unguis*), *Chaetomium globosum*, *Penicillium species* (*P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. expansum*), *Rhizopus stolonifer* и *Rhodotorula mucilaginosa*. Следует отметить, что виды *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *R. stolonifera*, и *R. mucilaginosa* могут вызывать аллергические реакции, а *R. mucilaginosa* принадлежит к оппортунистическим патогенам. Представляет определенный интерес тот факт, что в изученных образцах, взятых из различных мест модуля, не было обнаружено архей (Mora et al., 2019). Проведенное ESA исследование также включало сравнительный анализ резистентных свойств бортовых и земных штаммов одинаковых видов. Анализу подвергли 29 изолятов, в основном представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus*, и *Staphylococcus*. Релевантные представители видов тестировали на устойчивость к 17 клинически значимым антибиотикам. Статистически достоверных отличий в резистентных свойствах между штаммами, обитающими на МКС, и их «земными контролями» обнаружено не было. В японском модуле “Kibo” с 2009 г. выполняется постоянный мониторинг микробиома в рамках проекта “Microbe”, запущенным Японским аэрокосмическим исследовательским агентством JAXA (Ichijo et al., 2013, 2016, 2020). Образцы, собранные с поверхностей модуля, замораживаются при -80°C на МКС, затем транспортируются на Землю и анализируются. Для изучения структуры микробной популяции и количественной обсемененности кроме стандартных микробиологических подходов японские ученые используют 16S rRNA genotargeted amplicon sequencing (целое секвенирование ампликона гена 16S рРНК) и количественную ПЦР, соответственно. Исследование состава и свойств микробиома МКС необходимо, прежде всего, для обеспечения безопасной работы астронавтов на МКС (Yamaguchi et al., 2014), однако может оказать значительное влияние на изучение микробиомов чистых помещений на Земле, что важно для медицины, фармацевтической и медицинской промышленности.

1.8. Бактерии рода *Bacillus* на МКС

Бактерии рода *Bacillus* представляют род грамположительных палочковидных бактерий, относящихся к филуму Bacillota, классу Bacilli, порядку Bacillales, семейству Bacillaceae. В настоящее время род насчитывает 266 видов, среди которых могут встречаться облигатные аэробы и факультативные анаэробы (Christie, Setlow, 2020; Nikolaidis et al., 2022). Вегетативные клетки бацилл могут превращаться в эндоспоры, устойчивые к высокой температуре, радиации, высушиванию, дезинфицирующим средствам и оставаться в этом состоянии покоя в течение многих лет. Образование эндоспор обычно вызвано недо-

статком питательных веществ, высушиванием и высокой температурой (Beladjal et al., 2018). *B. anthracis* для образования спор необходим кислород, что имеет значение для распространения вида в окружающей среде. Устойчивость бацилл к высокой температуре, высушиванию, радиации, дезинфицирующим средствам и способность формировать биопленки приводит к тому, что их клетки или эндоспоры трудно удалить из приборов, материалов, рабочих поверхностей, поэтому они являются частой причиной заражения пищевых продуктов, животных и человека (Schmid et al., 2022).

Первичная идентификация бацилл основана на изучении их макроморфологических и микроморфологических характеристик (колонии, вегетативные клетки, эндоспоры) и физиолого-биохимических свойств (De Vos et al., 2009). Филосистематика бацилл изменялась в 2003, 2008, 2011 и 2022 годах. Исследование 1104 протеомов бактерий рода *Bacillus*, основанное на 114 белках, выявило взаимоотношения между различными видами, определяемыми как *Bacillus*. Различные штаммы были сгруппированы в виды на основе значений средней идентичности нуклеотидов с пороговым значением вида 95% (Nikolaidis et al., 2022).

Спорообразующие бактерии, которые ранее были выявлены на МКС и других космических аппаратах, практически все относились к роду *Bacillus* (Castro, 2004; LaDuc et al., 2004; Novikova et al., 2006; Timmerly et al., 2011; Mora et al., 2019). Кроме спорообразующих бактерий на МКС были обнаружены также представители разных родов неспорообразующих бактерий (Castro, 2004; LaDuc et al., 2004; Novikova et al., 2006; Timmerly et al., 2011; Mora et al., 2016 a, 2019). Не образуя спор, позволяющих в течение месяцев и даже лет сохранять жизнеспособность в окружающей среде, представители этой группы могут выживать в воздухе и на элементах оборудования за счет органических веществ – остатков пищи, слизи, водяных паров, чешуек эпителия, пыли и т.п. Однако эти бактерии легко уничтожаются при действии дезинфицирующих растворов или облучения.

Поэтому особенно важную роль на МКС могут играть спорообразующие виды, которые могут в течение длительного времени выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды и с трудом уничтожаются методами антисептики. Наличие бацилл связано с их способностью образовывать эндоспоры, что объясняет чрезвычайно высокую устойчивость к высушиванию, обработке дезрастворами, УФ-и космическому излучению и недостатку питательных веществ (Horneck et al., 2012). Так на МКС обнаружен штамм *B. licheniformis* 24, обладающий повышенной устойчивостью к перекиси водорода по сравнению с “земным” штаммом *B. licheniformis* В-10956 (Карпов и др. 2020). У штамма *B. licheniformis* 24 наблюдается сверхэкспрессия генов ферментов, нейтрализующих активные формы кислорода: каталазы (*katX*) и супероксиддисмутаза

(*sodA* и *sodF*).

Бациллы оказались одной из преобладающих на МКС групп бактерий на уровне рода (Chęcinska et al., 2019). При этом показано, что доминирующими видами бацилл на МКС являются *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. safensis*, *B. thermoamylovorans*, *B. sonorensis* (Castro, 2004; La Duc et al., 2004; Novikova et al., 2006; Timmerly et al., 2011; Moissl-Eichinger et al., 2016; Chęcinska-Sielaff et al., 2019; Mora et al., 2016 a, 2019; Quagliariello et al., 2022). Показано, что бактерии рода *Bacillus* способны к процессу биодеградации ксенобиотиков. Представители рода разрушают в аэробных условиях резины, пластики, простые ароматические соединения, синтетические волокна. Так *B. subtilis* и *B. mycoides* в условиях повышенной температуры в анаэробных условиях разрушают некоторые синтетические волокна, широкий набор химических соединений, в том числе ароматических веществ, поверхностно активных веществ типа алкилбензолсульфонатов, азокрасителей, гетероциклических соединений. *B. cereus* и *B. subtilis* в анаэробных условиях осуществляют процесс восстановительного расщепления азокрасителей с образованием соответствующих ароматических аминов (Sugiura et al., 2006).

В литературе отмечено образование бациллами токсинов, их аллергические и патогенные свойства (Farrar, Reboli, 2006). Так, аллергические свойства были описаны для *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, патогенные штаммы встречаются среди *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* и других видов. Таким образом, кроме патогенного вида *B. anthracis*, многие другие виды также могут являться оппортунистическими и даже патогенными (Farrar, Reboli, 2006; Ehling-Schulz et al., 2019; Bianco et al., 2021). Бациллярные инфекции разделяют на 3 группы. Первая и вторая группы болезней вызываются в основном *B. cereus*, *B. sphaericus* и *B. thuringiensis*. Это поражения глаз и инфекции глубоких тканей. Третью группу заболеваний представляют инфекции, вызванные диссеминированием клеток бацилл из очага поражения лимфогенным или гематогенным путями по всему организму. Возникают бактериемия, эндокардит, менингит и другие формы генерализованной бактериальной инфекции. Основным видом, вызывающим такие инфекции, является *B. cereus* (Uchino et al., 2012; Schmid et al., 2021). Следовательно, *B. cereus* является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. При этом *B. cereus* формирует особую группу видов, находящихся в пределах 97% идентичности по 16S рНК и включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и *B. anthracis*. Эти виды, согласно классификационным стандартам, должны представлять собой фактически один вид, но по медицинским причинам они считаются отдельными видами (Ehling-Schulz et al., 2019).

Одним из свойств бацилл является их устойчивость к антибиотикам. До 2021 года не существовал список антибиотиков, рекомендованных EUCAST для подавления инфекций, вызываемых штаммами рода *Bacillus*. В последних выпусках EUCAST (EUCAST 2021-2023) уже появился этот список антибиотиков, а также критерии интерпретации для оценки устойчивости бактерий *Bacillus* spp. к рекомендованным антибиотикам с помощью диско-диффузионного метода. В список антибиотиков EUCAST включены 9 антибиотиков – имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид. Поскольку список рекомендованных для бацилл EUCAST антибиотиков появился недавно, информации о такой важной клинической характеристике бактерий рода *Bacillus*, как устойчивость к антибиотикам, особенно для обитающих на МКС штаммов, еще очень мало. Поэтому изучение резистентности к антибиотикам у штаммов бацилл, выделенных из МКС и других асептических помещений, например, лаборатории для отбора крови, является очень актуальной задачей.

Глава 2. Характеристика микробного сообщества больничных учреждений

2.1. Внутрибольничные бактериальные инфекции

К внутрибольничным инфекциям (ВБИ) относятся заболевания как микробного, так и вирусного происхождения, которые развиваются у пациента во время его лечения в стационаре (включая 30 дней после выписки) или амбулаторного лечения, а также заболевания больничного персонала в силу осуществления им служебной деятельности (Зверев, Бойченко, 2019). Для предотвращения проникновения бактерий и грибов в помещения учреждений здравоохранения, особенно в зоны, где требуется особая чистота – родильные и хирургические отделения, отделения интенсивной терапии, лаборатории для отбора проб крови, комнаты для амбулаторных медицинских манипуляций, проводится комплекс мероприятий по предотвращению заноса микроорганизмов в эти зоны с помощью использования НЕРА-фильтров и удалению микроорганизмов с рабочих поверхностей чаще всего с помощью обработки дезрастворами и УФ-облучением. Как же попадают микроорганизмы в больницы и чистые зоны медицинских учреждений? Этот процесс может происходить на догоспитальном и госпитальном этапах.

2.2. Догоспитальный этап

Пациенты лечебных учреждений заражаются внутрибольничными инфекциями, вызванными супербактериями (HAIS) еще в машинах скорой помощи, которые являются первым важным элементом связи между пациентами и больницами. Машины представля-

ют собой переносчик супербактерий и внутрибольничных инфекций от одних пациентов к другим и затем к медицинским работникам (Alrazeeni, Alsufi, 2014; O'Hara et al., 2017). Больше того, HAIS часто передаются пациентам прямо из рук медицинских работников во время оказания ими медицинской помощи пациентам в инфицированных бактериями помещениях неотложной медицинской помощи. Например, было обнаружено, что внебольничные и госпитальные штаммы метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA), выделенные из окружающей среды, генетически сходны с *S. aureus* и назальными изолятами MRSA, выделенными у сотрудников службы неотложной медицинской помощи. Это говорит о том, что возможна передача MRSA между медицинским персоналом, поверхностями окружающей среды и пациентами на догоспитальном этапе (Roberts et al., 2011). Исследования с использованием методов, основанных на культивировании микроорганизмов, выявили высокую частоту встречаемости золотистого стафилококка и других потенциальных внутрибольничных патогенов на поверхностях интерьера машин скорой помощи (Noh et al., 2011, Varona-Barquin et al., 2017). В других исследованиях с использованием метода NGS и метагеномного анализа показана более широкая картина присутствия микроорганизмов в машинах скорой помощи. Так в США были отобраны методом смыва с поверхностей интерьера машин скорой помощи 1407 образцов для получения ДНК и 398 из них были секвенированы (O'Hara et al., 2017). Образцы были выбраны таким образом, чтобы включать все поверхности машин и машины разных штатов (137 машин в 19 городах и шести штатах). В смывах было обнаружено 127 видов бактерий, но наиболее распространенными оказались *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, *B. cereus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Propionibacterium acnes*, *Enterobacter cloacae*, *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae* (O'Hara et al., 2017). Кроме перечисленных видов были обнаружены, но в меньшем количестве образцов, также *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium*, *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), *Streptococcus parasanguinis*, *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Микобактерии туберкулеза также были обнаружены в 2,3% образцов. Многие из этих видов, включая *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. cereus* и *E. faecalis*, обладали устойчивостью к антибиотикам (O'Hara et al., 2017). В литературе есть данные о высокой распространенности микроорганизмов, вызывающих заболевания, еще в отделениях для ухода за пациентами машин скорой помощи. Чаще всего это methicillin-resistant *S. aureus* (Brown et al., 2010; Obenza et al., 2022) и coagulase-negative species *Staphylococcus capitis* (Noh et al., 2011). Показано, что *S. epidermidis* является наиболее распространенным видом бактериальных ин-

фекций, в частности, частой причиной бактериемий, связанных с постоянными медицинскими процедурами или имплантированными инородными телами (Becker et al., 2014).

2.3. Госпитальный этап

Микробные сообщества, поступающие в госпиталь из окружающей среды, особенно тяжело влияют на здоровье пациентов в медицинских учреждениях, где больные часто имеют повышенную восприимчивость из-за их болезни, инвазивных процедур, состояния иммуносупрессии или травм (Freedberg et al., 2016). Поэтому такие больные, а также практически здоровые люди, в больнице могут заразиться патогенными бактериями или супербактериями, затем эта инфекция может закрепиться и распространиться в больнице, а далее начать бесконтрольно разрастаться в пределах города (Mody et al., 2019). Учитывая высокий уровень распространения HAIS, при котором, например, в США каждый 25-й больничный пациент заражается инфекциями HAIS, а также увеличение числа инфекций, устойчивых к противомикробным препаратам, существует настоятельная необходимость в характеристике микробных популяций в медицинских учреждениях на госпитальном этапе на всех уровнях обслуживания больных для повышения качества их лечения (Glance et al., 2011). Например, уже скрининг поверхностей дверных ручек в больнице методом высева выявил на них бактерии, связанные с пылью и мусором, такие как представители родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Aeribacillus*, а также бактерии, ассоциированных с кожей, например, *Staphylococcus* и *Corynebacterium*. Проверка на резистентность показала наличие у многих из видов этих бактерий мобильного гена, кодирующего бета-лактамазу (*bla*) (Eirakaiby et al., 2019). Достижения в области секвенирования и применение метода NGS и метагеномного анализа теперь позволяют количественно оценивать и характеризовать микробиомы больниц и понимать роль некоторых факторов, формирующих состав сообщества и динамику микробных госпитальных популяций (Roux et al., 2016). Эти популяции формируются уже на догоспитальном уровне (Obenza et al., 2022), а в больнице только окончательно оформляются (Зверев, Бойченко, 2019). Однако, как правило, трудно определить на каком этапе произошло заражение больного ВБИ – при проведении амбулаторных процедур или в процессе госпитализации в лечебном учреждении. Всего насчитывается более 250 видов микроорганизмов, которые могут вызывать ВБИ (Obenza et al., 2022). В эпоху отсутствия антибиотиков основными из них являлись стрептококки и клостридии. После начала клинического применения антибиотиков появилось много патогенных возбудителей ВБИ, которые сформировались под влиянием антибиотиков из ранее непатогенных штаммов и видов. Это *P. aeruginosa*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, *St. saprophiticus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus durans*, *Klebsiella* spp, *Providencia* spp, *Acinetobacter* spp, *Citrobacter* spp, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* и другие. Как видно, в

общем, это те же виды, которыми пациенты амбулаторий и больниц заражаются еще на догоспитальном уровне, например, в машине скорой помощи или в помещениях неотложной медицинской помощи (Brown et al., 2010; Alrazeeni, Alsufi, 2014; O'Hara et al., 2017; Obenza et al., 2022). Циркуляция того или иного микроорганизма в отделении больницы приводит к естественному отбору наиболее устойчивых штаммов, и прежде всего устойчивых к дезрастворам и УФ-облучению. Уже на госпитальном уровне происходят и мутации с образованием наиболее устойчивого к антибиотикам госпитального штамма. Следовательно, «госпитальный штамм» представляет собой штамм микроорганизма, появившийся в результате отбора и мутаций, а также переноса генов с помощью плазмид или других механизмов горизонтального переноса. Такой штамм отличается от «дикого» (исходного) штамма физиолого-биохимическими и генетическими особенностями, которые позволяют ему выживать в условиях больницы. Обычно одной из основных характеристик штамма ВБИ является устойчивость в факторам внешней среды (УФ-облучение, температура, H₂O₂, pH, O₂), устойчивость к действию распространенных типов антисептиков и главное – резистентность к одному или нескольким антибиотикам широкого спектра действия (Зверев, Бойченко, 2019; Obenza et al., 2022).

Глава 3. Устойчивость бактерий к антибиотикам

3.1. Масштабы проблемы

Устойчивость к противомикробным препаратам – естественное биологическое явление, присущее многим микроорганизмам. Задолго до открытия антимикробных препаратов микроорганизмы использовали различные вещества для создания конкуренции за субстрат. Вследствие этого в ходе эволюций были выработаны определенные механизмы защиты от веществ, ингибирующих метаболизм микроба. На данный момент повышенная природная устойчивость является характеристикой многих видов, также устойчивость может быть приобретенной и свойственной определенным штаммам, но не являться видовой характеристикой. Основным параметром, определяющим взаимоотношения между микроорганизмом и антимикробным препаратом, является величина минимальной ингибирующей концентраций антибиотика (Obenza et al., 2022).

У бактерий обнаружены несколько механизмов повышения устойчивости к антимикробным препаратам. К ним относятся: модификация мишени действия антибиотика, инактивация антибиотика, активное выведения антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки. Все эти механизмы способны функционировать как по отдельности, так и в комплексе (Prestinaci et al., 2015; Peterson, Kaur, 2018).

3.2. Основные понятия и термины

В течение последнего десятилетия сформировались определения терминов, касающихся резистентности бактерий к антибиотикам. Внутренняя устойчивость обнаруживается в геноме видов бактерий, является постоянным видовым признаком и дает бактериям способность противостоять действию определенного противомикробного агента. Внутренняя устойчивость не зависит от горизонтального переноса генов. Причиной внутренней устойчивости может быть: отсутствие сродства препарата к мишени действия, сложность проникновения препарата внутрь бактериальной клетки, активный вывод препарата из клетки эффлюксными насосами и наличие ферментов, расщепляющих антибиотик (Bergh et al., 2017; Schwarz et al., 2017; Peterson, Kaur, 2018).

Приобретенная устойчивость это явление, когда в дополнение к внутренней резистентности бактерии могут приобрести способность противостоять действию противомикробного агента, который ранее был эффективен в отношении данного микроорганизма. В отличие от врожденной резистентности, приобретенная резистентность развивается у некоторых штаммов или субпопуляций каждого конкретного вида бактерий. Приобретенная резистентность возникает в результате изменения гена и/или обмена путем мутации определенного гена или горизонтального переноса генов посредством трансформации, конъюгации или трансдукции. Эти генетические изменения могут способствовать развитию различных механизмов резистентности (Cassir et al., 2015). В последнее время в публикациях появилось большое количество двусмысленных терминов, касающихся устойчивости бактерий к антибиотикам – «устойчивость», «толерантность», «стойкость» и т.п. Особенно большую дискуссию вызвало явление, наблюдаемое в результате воздействия антибиотиков на бактерии – появление в популяции клеток со сниженным или остановленным метаболизмом (Bergh et al., 2017). Кроме того, официальные определения режимов выживания бактерий в присутствии антибиотиков, также часто имеют неоднозначные определения. Так Европейский комитет по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам считает, что микроорганизм считается резистентным, когда существует высокая вероятность неудачи лекарственной терапии даже при повышенном воздействии антибиотика (EUCAST, 2021). Но это определение может быть распространено на довольно разнообразную группу бактерий, включая истинно резистентные, толерантные, спящие и персистирующие клетки (Bergh et al., 2017). Резистентность в литературе определяется, как наследуемая способность бактерий расти в присутствии концентрации лекарственных средств, которая превышает нормальную концентрацию антибиотика, используемого в терапии пациента (Kester, Fortune 2014; Brauner et al., 2016). Персистенция – феномен популяционного уровня, способность небольшой части популяции

(толерантных клеток) пережить воздействие бактерицидной концентрации препарата, прекратив свой рост и превратившись в клетки-персистеры (Balaban et al., 2019). Спящие клетки – обратимое состояние низкой метаболической активности, при котором клетки могут сохраняться в состоянии покоя в течение длительного времени без деления (Karrelants et al., 1993) или механизм, с помощью которого клетки становятся толерантными или стойкими (Vakkeren et al., 2020). Жизнеспособные, но некультивируемые клетки – это клетки, которые теряют способность роста на тех лабораторных питательных средах, которые раньше обеспечивали их культивирование, но эти клетки остаются жизнеспособными (Mendis, 2014; Aугapetyan et al., 2018). Но самая большая неопределенность в литературе существует по отношению к термину «толерантность». Так толерантность определяют как способность генетически восприимчивых бактерий выживать при концентрациях бактерицидного антибиотика выше минимальной ингибирующей концентрации (Cohen et al., 2013; Michiels et al., 2016), или при кратковременном воздействии высоких концентраций антибиотика без изменения МИК (Brauner et al., 2016), или при кратковременном воздействии антибиотиков в концентрациях обычно для них смертельных (Kester, Fortune, 2014). Кроме того, часто повышение устойчивости бактерий к бактерицидным антибиотикам и их низкую скорость метаболизма связывают с низкой скоростью поглощения лекарств в условиях бактериального стресса (Fisher et al., 2017). Следовательно, основными отличительными критериями для термина «толерантность» являются выживание без роста бактерий или выживание с замедленным ростом и снижением метаболизма.

3.3. Основные методы определения резистентности к антибиотикам

Разработкой стандартов тестирования на чувствительность к антибиотикам и антимикотикам занимаются в Европейском комитете по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (EUCAST) и институте клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Поскольку активность антибиотиков в отношении различных микроорганизмов варьирует, в большинстве случаев можно надежно предсказать устойчивость возбудителя, только точно выяснив его видовую принадлежность. При лабораторном ручном определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используют несколько методов: метод серийных разведений, диско-диффузионный метод и E-test (Durand et al., 2021).

3.3.1. Метод последовательных (серийных) разведений

Основным методом определения минимальной ингибирующей концентрации или минимальной подавляющей концентрации является метод последовательных разведений (Рисунок 1). Метод последовательных разведений в бульоне является референтным методом определения МИК и регламентируется международным стандартом ISO 20776-

1:2006. Для определения МИК бактерий с обычными питательными потребностями EUCAST рекомендует использовать метод микроразведений в бульоне в точном соответствии со стандартом ISO 20776-1:2006 (www.eucast.org, 2022).

3.3.2. Дisko-диффузионный метод

Метод является одним из первых методов определения чувствительности к антибиотикам и до настоящего времени остается наиболее распространенным в практических бактериологических лабораториях (Рисунок 1). Метод может применяться для исследования большинства бактериальных и грибковых возбудителей, в том числе и наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антибиотиков и антимикотиков, не требует использования специального оборудования и признан EUCAST (www.eucast.org, 2022).

3.3.3. E-test

E-тест (эпсилометрический тест) представляет собой метод «экспоненциального градиента» для определения устойчивости к противомикробным препаратам. E-тест разработан для количественной оценки чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам (Durand et al., 2021). E-тест состоит из известного, непрерывного и экспоненциального градиента концентрации антибиотика, иммобилизованного вдоль прямоугольной пластиковой тест-полоски. При нанесении этой тест-полоски на инокулированную чашку с агаром происходит немедленное высвобождение лекарственного средства и установление градиента концентрации противомикробного препарата в агаровой среде. Через 20-24 часа инкубации каплеобразная зона ингибирования пересекает градуированную тест-полоску в зоне ингибирующей концентрации антибиотика. Тестовую полосу считывают, получают симметричный эллипс ингибирования. Пересечение нижней части эллипсоидной зоны ингибирования роста с тест-полоской указывает на значение МИК (Рисунок 1).

Существует модификация E-теста для выявления штаммов обладающих металло- β -лактамазами (МБЛ). Модифицированная тестовая полоска содержит комбинацию β -лактамного субстрата и ингибитора β -лактамов/металло- β -лактамаз, на данный момент такой тест способен обнаруживать большое число известных клинически значимых металло- β -лактамаз. Таким образом, модифицированные тест полоски являются удобным инструментом для первичного скрининга устойчивых штаммов бактерии, благодаря скорости выполнения и высокой воспроизводимости результатов.

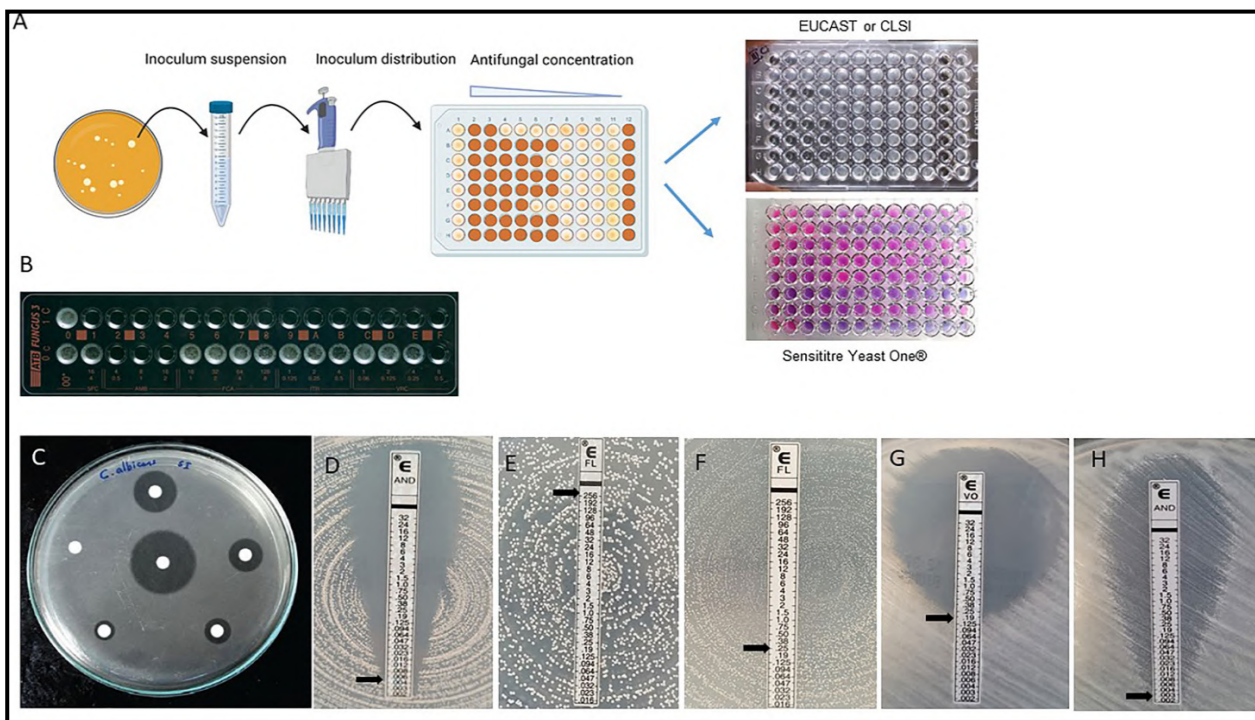


Рисунок 1. Основные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (Durand et al., 2021; www.eucast.org. 2022);

A, B – метод разведений с планшетах и пробирках;

C – диско-диффузионный метод;

D, E, F, G, H – E-test

3.3.4. Автоматизированные системы

Также существуют автоматизированные системы, позволяющие определять чувствительность дрожжей, например, Vitek 2 (Био Мерье), или дрожжей и плесневых грибов, например, Sensititre (Био Витрум). Коммерческие автоматизированные системы для идентификации и тестирования чувствительности бактерий используются в большинстве современных лабораторий клинической микробиологии (Durand et al., 2021). Из-за простоты использования и экономической эффективности автоматические анализаторы часто являются более предпочтительными методами по сравнению с трудоемкими эталонными методами CLSI (микроразведений в бульоне и дисковой диффузии). Например, современный анализатор VITEK 2 отвечает потребностям клинических лабораторий в быстрой и точной микробной идентификации. Технология VITEK 2 включает в себя расширенную идентификационную базу данных, которая регулярно пополняется новыми данными, ускоренную обработку результатов, повышенную достоверность и минимальное время обучения персонала. Современные микробиологические анализаторы обеспечивают высокий уровень автоматизации, повышая безопасность сотрудников лаборатории и снижая количество повторяющихся рутинных операций.



Рисунок 2. Автоматический микробиологический анализатор Vitek 2 Compact.

3.4. Новая классификация стратегий выживания бактерий при контакте с антибиотиками

С целью более точной классификации стратегий выживания бактерий при контакте с антибиотиками недавно была предложена новая системы классификации (Рисунок 3), которая включает лучшее понимание взаимосвязи между выживаемостью бактерий в присутствии антибиотиков и молекулярными механизмами подавления клеточного метаболизма (Chebotar et al., 2021).

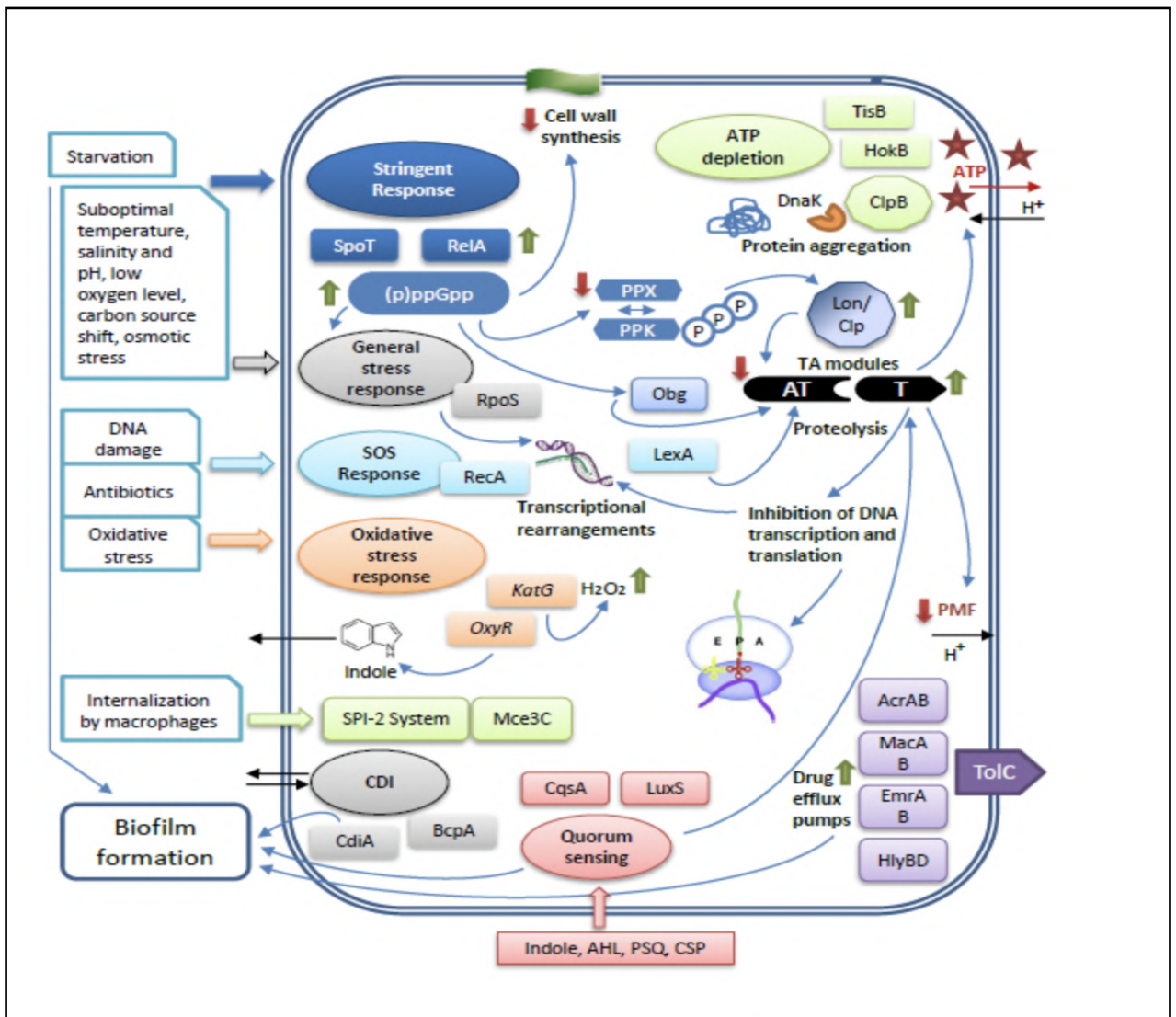


Рисунок 3. Основные метаболические пути, триггеры и эффекторы, участвующие в инициации состояния антибиотической персистенции, толерантности и покоя. Различные экологические триггеры, показанные слева, способствуют образованию персистирующих, толерантных и спящих (покоящихся) клеток. Каждый механизм с его белками и эффекторами помечен другим цветом. Повышенный и пониженный уровни выработки (активация и подавление) показаны зелеными и красными вертикальными стрелками соответственно. Сокращения: CDI - контактно-зависимое ингибирование; АТ/Т - токсин/антитоксин; РРХ - полифосфатгидролаза; РРК - полифосфаткиназа; Р - неорганический фосфат; РМФ - протонная движущая сила; АНЛ - ацил-гомосерин-лактон; РQS - гептилгидроксихинолон; CSP - индуцируемый стрессом феромонный пептид (Chebotar et al., 2021).

На рисунке 3 показаны основные механизмы возникновения состояний персистенции, толерантности и покоя бактерий во время различных стрессов и воздействия антибиотиков. Факторы окружающей среды действуют как сигналы инициации стресса, пере-

ключающие метаболизм бактерий и переводящие нормальные клетки в персистентное, спящее или толерантное состояния. Основные механизмы включают строгий ответ, реакции SOS и окислительного стресса, общую реакцию на стресс, активацию TA-модулей, истощение АТФ и агрегацию белка, реакции на экзогенные бактериальные сигналы (контактно-зависимое ингибирование роста и регуляцию кворума, интернализацию макрофагами, сверхэкспрессию лекарственного средства, откачивающие насосы (эффлюкс) и образование биопленки (Chebotar et al., 2021).

В этом же обзоре (Chebotar et al., 2021) авторы предложили новую стратегию классификации бактерий, способных выживать в присутствии противомикробных препаратов, (Рисунок 4). Предлагаемая система классификации основана на таких критериях, как репродуктивная способность, эволюционное сохранение признака внутри вида и наличие генов, определяющих переход в метаболически неактивное состояние со сниженным или полностью остановленным метаболизмом (Chebotar et al., 2021). Стратегии выживания бактерий в присутствии антибиотиков по этой системе классификации можно разделить на две большие группы в зависимости от способности бактерий размножаться. К первой группе относятся бактерии с нормальной метаболической активностью, которые способны размножаться в присутствии концентраций антибиотиков, превышающих МИК для чувствительных штаммов (штаммов дикого типа) (Bergh et al., 2017; Chebotar et al., 2021). Эта группа включает в себя две подгруппы бактерий, обладающих резистентностью – бактерии с внутренней резистентностью и бактерии с адаптивной резистентностью (Рисунок 4). Внутренняя резистентность эволюционно сохраняется внутри вида. Механизмы внутренней резистентности обычно основаны на сложных механизмах, которые, в зависимости от вида бактерий, зависят от таких особенностей организма, как инактивация антибиотиков β -лактамазами, отсутствие мишеней для антибиотиков, наличие эффлюксных насосов, изменение проницаемости мембран и наличие определенных мутаций, влияющих на внутриклеточную мишень антимикробиотика (Cox, Wright, 2013). Внутренняя устойчивость является видоспецифической чертой и ее наличие к определенному антибиотику у конкретного бактериального вида указывает на клиническую неэффективность препарата против всех представителей данного вида. Вид, обладающий внутренней резистентностью, демонстрирует резистентность только к определенному набору антибиотиков, список которых эксперты EUCAST считают аксиомой для клиницистов (EUCAST, 2022 www.eucast.org. 2022). При этом внутренняя резистентность штаммов к определенному препарату в пределах одного вида может сочетаться с адаптивной устойчивостью к другим антибиотикам. Стратегии выживания второй группы бактерий в присутствии антибиотиков охватывает различные формы бактерий со сниженным или остановленным ме-

таболизмом, которые способны выживать, но не размножаться в условиях антибиотического стресса. Вторая группа бактерии со сниженным или остановленным метаболизмом (BRHM) включает следующие подгруппы: 1) бактерии, несущие специализированные гены, которые индуцируют переход клетки в состояние подавленного или остановленного метаболизма; 2) бактерии, которые претерпевают переход в состояние подавленной или остановленной метаболической активности без участия специализированных генов; 3) клеточные формы с измененными морфологическими структурами – спорами, цистами и клетками, похожими на цисты (Chebotar et al., 2021).

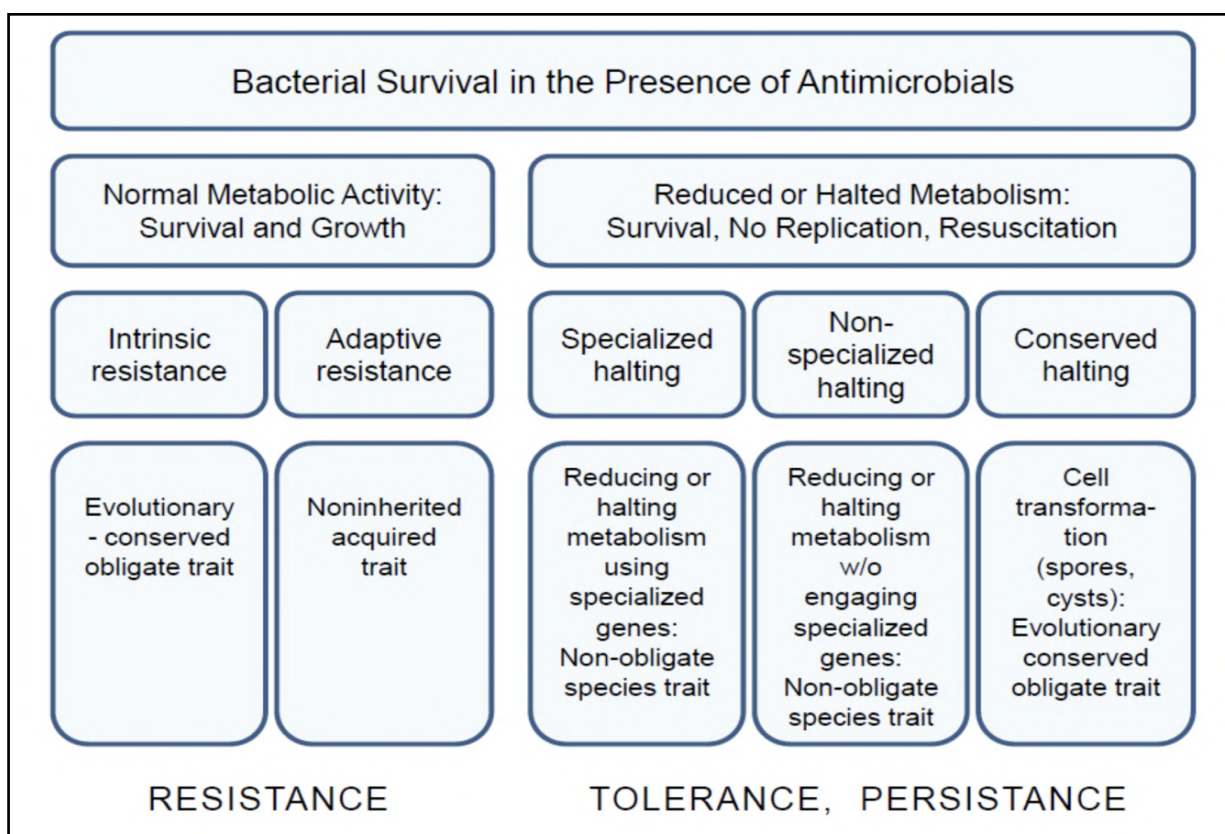


Рисунок 4. Стратегии выживания бактерий в присутствии противомикробных агентов (Chebotar et al., 2021).

Эти три подгруппы клеток второй группы на рисунке 4 обозначены как «специализированная остановка (роста)», «неспециализированная остановка» и «консервативная остановка» соответственно. Под специализированными генами у бактерий подгруппы 1, которые индуцируют переход клетки в состояние подавленного или остановленного метаболизма, авторы в первую очередь подразумевали гены и механизмы, связанные с функционированием генетического модуля токсин-антитоксин (Lewis, 2007; Chebotar et al., 2021). В условиях стресса выработка антитоксина может быть частично подавлена, что не приводит к необратимой гибели клеток, а скорее индуцирует переход клетки в персистирующее состояние (Bergh et al., 2017). Состояние клеток со сниженным или остановлен-

ным метаболизмом может сопровождаться не только функциональными изменениями, но может сочетаться с трансформацией клеточной морфологической структуры, когда клетки, снижающие свою метаболическую активность, при этом резко изменяют свою морфологию и химический состав. Примерами таких клеток являются споры (эндоспоры), цисты и цистоподобные клетки. Они помещены в отдельную подгруппу в предложенном рисунке стратегий выживания клеток в присутствии антибиотиков (Рисунок 4). Известно, что способность образовывать споры, цисты и цистоподобные клетки является эволюционно консервативным признаком и контролируется совокупностями специализированных генов (Jedrzejak, Huang, 2003).

3.5. Механизмы саморезистентности в организмах-продуцентах антибиотиков

Большинство используемых сегодня антибиотиков синтезируются представителями бактерий из класса Actinobacteria и значительно реже другими бактериями или грибами. При этом почти 80% антибиотиков актинобактериального происхождения вырабатываются почвенными бактериями рода *Streptomyces* (Varaka et al., 2016). Очевидно, что микроорганизмы, синтезирующие антибиотики, обязательно должны содержать механизмы устойчивости к своим собственным антибиотикам. Бактерии, продуцирующие антибиотики, содержат множество сложных механизмов для самозащиты от своих собственных антибиотиков (Рисунок 5). Очень часто они содержат несколько этих механизмов одновременно, чтобы обеспечить полную защиту от вырабатываемых ими антибиотических веществ. Интересно, что генетические детерминанты саморезистентности к антибиотикам у бактерий-продуцентов почти всегда сгруппированы вместе с генами биосинтеза антибиотиков, а экспрессия этих генов регулируется совместно (Mak et al., 2014).

3.5.1. Модификация антибиотиков

Модификация антибиотика является стандартной стратегией, используемой организмом-продуцентом для того, чтобы сделать антибиотик неэффективным, особенно в случае аминогликозидных антибиотиков, таких как гентамицин, канамицин, стрептомицин, а также хлорамфеникол и β -лактамы (Рисунок 5). Известно, что у бактерий-продуцентов существует большое количество ферментов модификации аминогликозидов, с помощью N-ацетилтрансфераз, фосфотрансфераз и аденилтрансфераз, которые ацетилируют, фосфорилируют или аденилируют аминогликозидный антибиотик, делая его не опасным для самого продуцента. Эти ферменты были обнаружены у продуцентов антибиотиков из рода *Streptomyces* уже давно, причем они выполняют идентичные биохимические реакции, наблюдаемые у устойчивых к антибиотикам клинических штаммов (Walker, 1970; Benveniste, 1973; Davies, 1994; Peterson, Kaur, 2018). Устойчивость к стрептомицину у продуцента *Streptomyces griseus* связана с функцией модифицирующего фермента стреп-

томицин-6-фосфотрансферазы, который превращает стрептомицин в неактивный предшественник этого антибиотика стрептомицин-6-фосфат. При этом экспрессия гена, кодирующего фермент стрептомицин-6-фосфотрансферазу, регулируется совместно с генами биосинтеза стрептомицина (Mak et al., 2014).

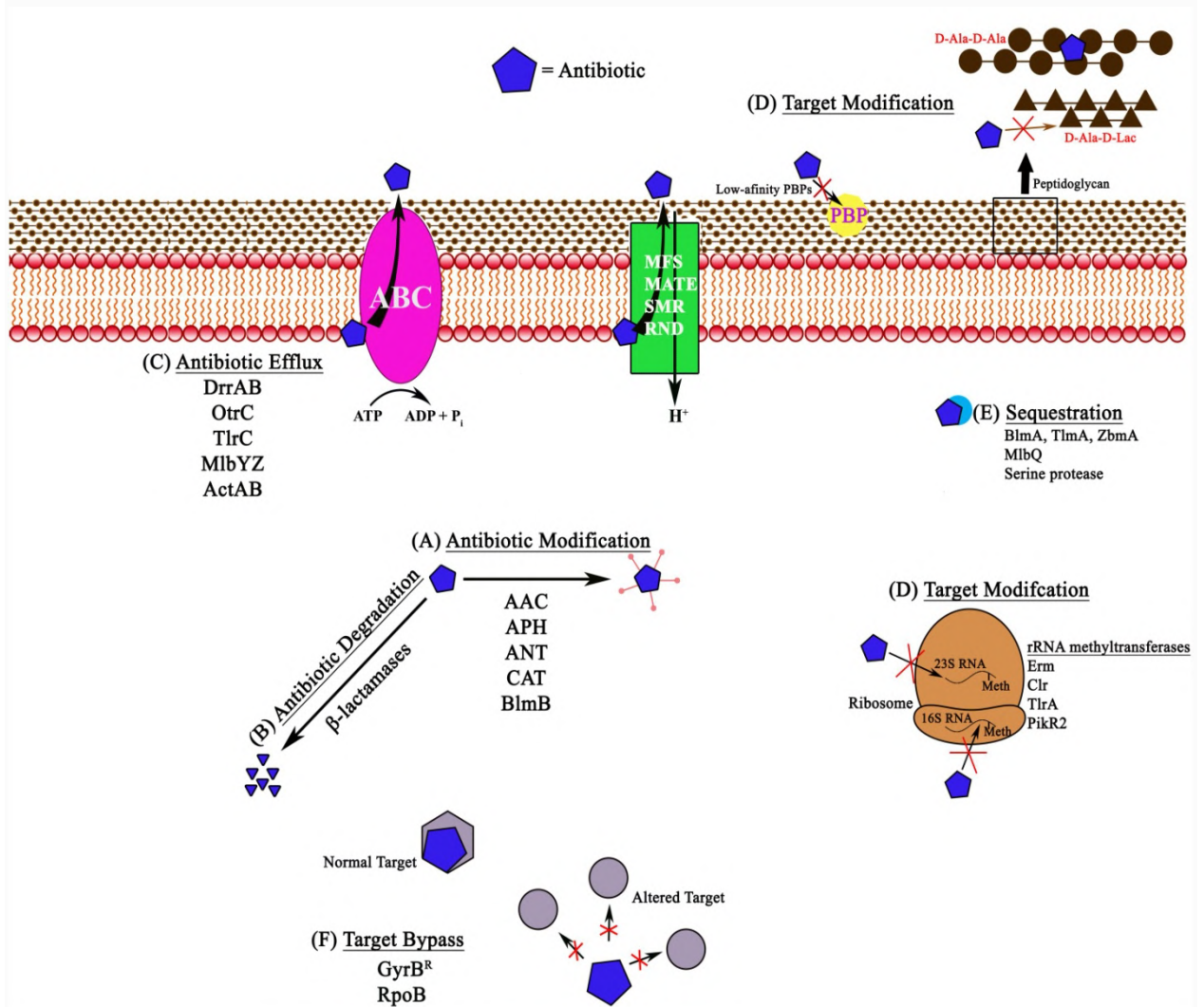


Рисунок 5. Схематическое представление различных механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам (Peterson, Kaur, 2018).

- A - модификация антибиотика
- B - деградация антибиотика
- C - насосы оттока антибиотиков
- D - модификация мишени
- F - смена мишени

Модификация антибиотика в качестве механизма самозащиты наблюдается и для других классов антибиотиков. Так *Streptomyces verticillus* и *Streptoalloteichus hindustanus* синтезируют соответственно блеомицин и таллизомин, при этом кластеры генов био-

синтеза этих антибиотиков содержат гены N-ацетилтрансфераз *BlmB* и *TlmB*. Ацетилтрансферазы осуществляют ацетилирование безметалловых форм блеомицина и таллизомицина, предотвращая правильное образование металлсвязывающего домена этих антибиотиков (Coughlin et al., 2014). Хлорамфеникол является еще одним антибиотиком, который может быть ацетилирован широко распространенной группой ферментов, известных как хлорамфениколацетилтрансферазы. Эти ферменты впервые обнаружены у представителей *Streptomyces* (Murray et al., 1989), а затем и у клинических штаммов бактерий (Schwarz et al., 2004).

3.5.2. Деградация антибиотиков

В отличие от модификации антибиотиков, устойчивость к β -лактамам антибиотикам обычно обеспечивается ферментами, гидролизующими антибиотики и известными как β -лактамазы. Эти ферменты широко распространены среди видов рода *Streptomyces*, но обнаружены также у патогенных и непатогенных бактерий (King et al., 2016; Ogawara, 2016; Peterson, Kaur, 2018).

Большинство видов *Streptomyces* синтезируют β -лактамазы конститутивно, поэтому их синтез не связан с резистентностью или синтезом β -лактамов. Присутствие β -лактамаз у продуцентов антибиотиков является «эволюционной загадкой», потому что трудно представить сосуществование в клетках-продуцентах одновременно синтезируемых ими β -лактамов и разрушающих эти же антибиотики β -лактамаз (Ogawara, 2015).

3.5.3. Системы оттока (эффлюкс)

Системы откачивания антибиотиков (эффлюкс) удаляют антибиотик из клетки, используя энергию гидролиза АТФ в насосах семейства ABC различных подсемейств (DrrAB, OtrC, TLRC, MlbYZ), или градиенты протонов в насосах семейств MFS, MATE, SMR, PACE и RND (Nazarov, 2022). В настоящее время эффлюксные насосы разделены на семь семейств (Рисунок 6). Это суперсемейство АТФ-связывающих кассет (ABC), семейство резистентности нодуляции деления (RND), суперсемейство основных посредников (MFS), семейство малых помп с множественной лекарственной устойчивостью (SMR), семейство экструзии соединений с множественной лекарственной и токсичной активностью (MATE), семейство выделения протеобактериальных антимикробных соединений (PACE) и семейство переносчиков п-аминобензоилглутамата (AbgT) (Henderson et al., 2021).

Такая система откачивающих насосов для удаления антибиотиков из клетки является еще одним широко используемым механизмом саморезистентности у *Streptomyces*, хотя обычно эффлюкс сочетается с другими механизмами, такими как модификация антибиотика или модификация мишени. Так штамм-продуцент *Streptomyces peucetius*, продуцирует два близкородственных противоопухолевых антибиотика, даунорубицин и доксоруби-

цин. Выведение этих антибиотиков из клеток у *S. peucetius* происходит с помощью переносчика семейства ABC (АТФ-связывающая кассета) подсемейства DrrAB, кодируемого генами *drrAB*, встроенными в кластер генов, ответственных за биосинтез этих антибиотиков (Guilfoile, Hutchinson, 1991). Саморезистентность у *Streptomyces rimosus* обеспечивается двумя эффлюксными белками: OtrB, расположенным в кластере биосинтеза антибиотиков, и OtrC, расположенным вне кластера биосинтеза (Mak et al., 2014).

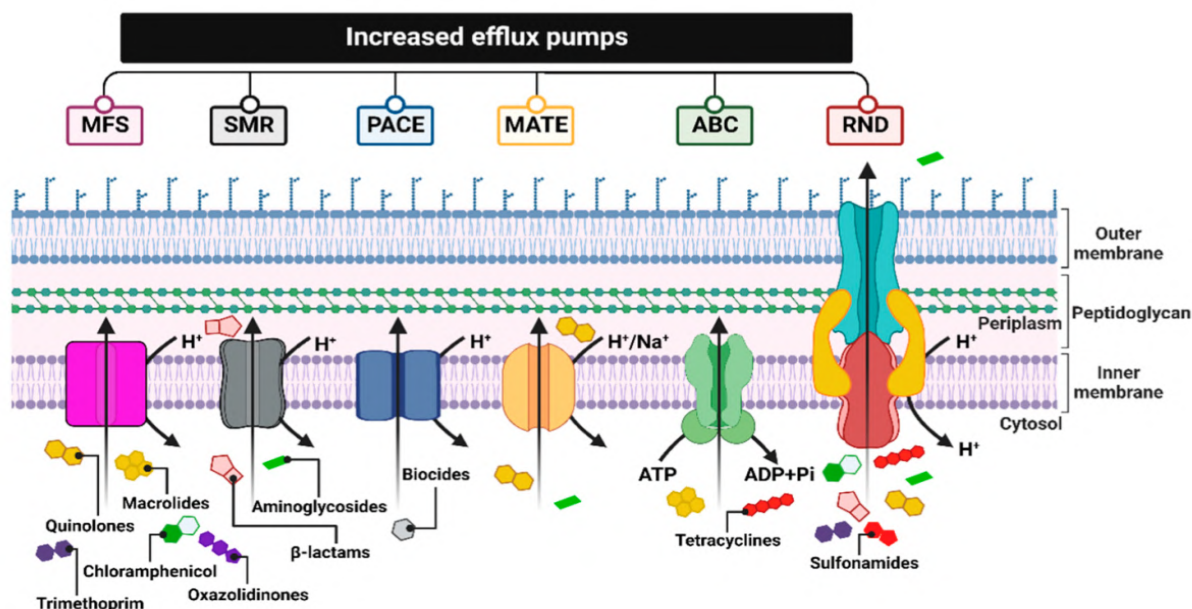


Рисунок 6. Краткое описание основных семейств эффлюксных транспортеров (Henderson et al., 2021):

MFS - суперсемейство основных посредников; **SMR** - семейство малых форм с множественной лекарственной устойчивостью; **PACE** – семейство выделения протеобактериальных антимикробных соединений; **MATE** - семейство экструзии соединений с множественной лекарственной и токсичной активностью; **ABC** - суперсемейство АТФ-связывающих кассет; **RND** - семейство, резистентности нодуляции деления.

Белок OtrB принадлежит к семейству основных фасилитаторов (MFS) транспортных белков, однако очень мало известно о его механизме действия и субстратной специфичности (Mak et al., 2014). Белок OtrC относится к семейству белков ABC, и как белок DrrAB, также придает множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) к множеству антибиотиков, включая ванкомицин, ампициллин, окситетрациклин, доксорубицин, офлоксацин (Yu et al., 2012; Mak et al., 2014). Эти примеры с насосами DrrAB и OtrC показывают возможность полиспецифического распознавания лекарств в этих системах эффлюкса и ставят несколько вопросов. И первый из них – зачем нужен переносчик нескольких лекарств в организме-производителе и каково происхождение полиспецифических систем

оттока антибиотиков и лекарств. Произошли ли эти системы от еще более древних систем оттока широкого спектра, которые могли бы служить общими защитными механизмами против токсинов у бактерий в природе. Было высказано предположение, что эффлюксные транспортеры антибиотиков могли быть перепрофилированы из систем оттока общей защиты очень давно (Martinez, 2018; Henderson et al., 2021).

3.5.4. Модификация мишени

Виды рода *Streptomyces*, несмотря на то, что они грамположительны, обладают высокой устойчивостью к пенициллинам, что обусловлено либо перепроизводством пенициллинсвязывающих белков, либо синтезом низкоаффинных РВРs. У бактерий обнаружены три класса РВРs (А, В и С) (Ogawara, 2015). Анализ кластеров биосинтеза бактерий, продуцирующих β -лактамы, показал, что они часто содержат гены для РВРs, что позволяет предположить их роль в саморезистентности (Liras, Martin, 2006; Ogawara, 2015). Модификация мишени также наблюдается для антибиотиков-макролидов, которые связываются с 50S-субъединицей рибосомы. Этот механизм включает, в частности, метилирование 23S рРНК метилтрансферазами (Douthwaite et al., 2004). Монометилирование (тип I) обычно обеспечивает умеренный уровень устойчивости, в то время как диметилирование (тип II) обеспечивает сильную устойчивость к макролидам (Fyfe et al., 2016).

3.5.5. Смена мишени

Смена мишени – это механизм резистентности, который обеспечивает генерацию дополнительных альтернативных мишеней путем создания мишени с низким сродством к антибиотику. Например, микроорганизм включает в мишень альтернативную В-субъединицу ДНК-гиразы для устойчивости к новобиоцину, альтернативную устойчивую РНК-полимеразу для резистентности к рифампицину или дополнительную синтазу жирных кислот для устойчивости к платенсимицину у *Streptomyces platensis* (Sanchez-Hidalgo et al., 2010; Peterson et al., 2014).

3.6. Происхождение устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов

Сосуществование бактерий-продуцентов и бактерий-непродуцентов в окружающей среде могло привести к совместной эволюции их механизмов резистентности. Детерминанты резистентности, обнаруженные у этих двух групп бактерий, привлекли значительное внимание в последние годы из-за их возможной связи с возникновением резистентности у патогенных клинических изолятов (Martinez, 2018). В условиях разворачивающейся перед нами глобальной эпидемии устойчивости бактерий к антибиотикам важно понять происхождение этих детерминант резистентности у патогенов. Вопрос о том, откуда берутся гены устойчивости к антибиотикам в клинике, очень интересует ученых и клиницистов (Marshall et al., 1998; Aminov, Mackie, 2007; Peterson, Kaur, 2018). Предложена

наглядная схема (Рисунок 7), показывающая резервуары генов устойчивости к антибиотикам, встречающихся в природе, и различные пути их перемещения в клинику (Peterson, Kaur, 2018).

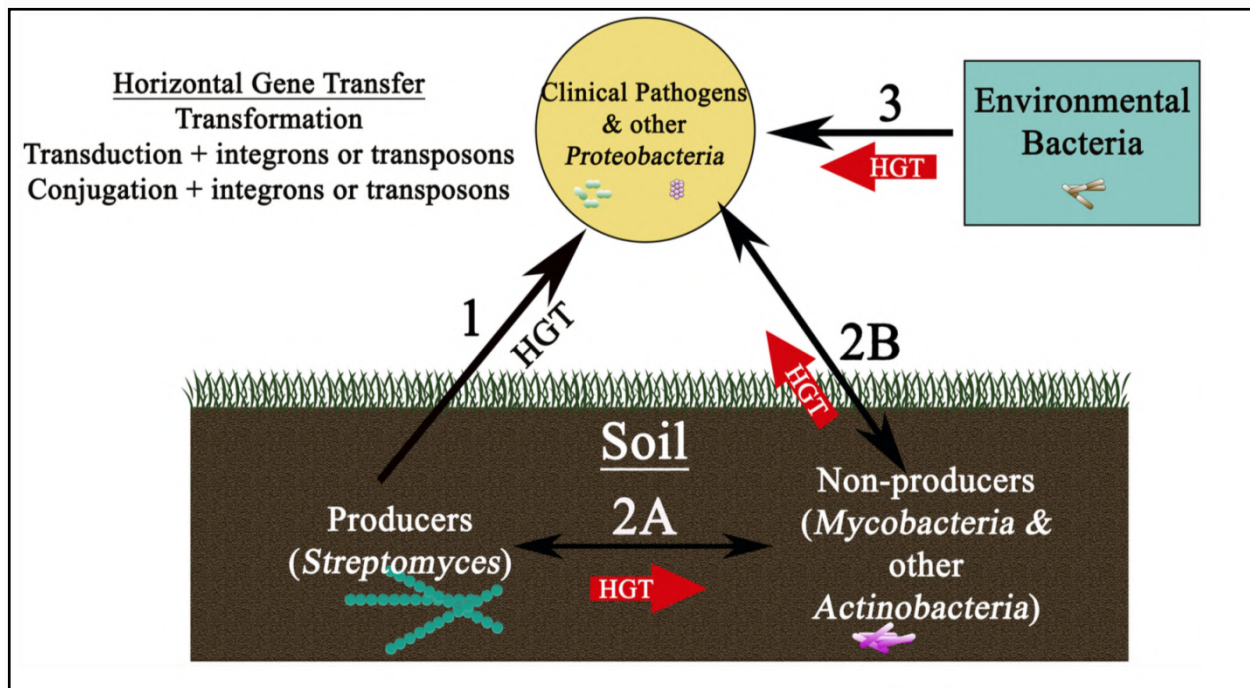


Рисунок 7. Схема, показывающая резервуары генов устойчивости к антибиотикам, встречающихся в природе, и различные пути их перемещения в клинику (Peterson, Kaur, 2018).

На рисунке 7 показано, что перенос генов устойчивости к клиническим изолятам может происходить различными путями, каждый из которых использует механизмы горизонтального переноса генов, потенциально включающие плазмиды, интегроны или транспозоны. Хотя прямой перенос детерминант устойчивости от продуцентов к клиническим штаммам возможен в почве (путь 1 на рисунке 7), но более вероятный путь может сначала включать перенос генов от почвенных бактерий-продуцентов антибиотиков к почвенным бактериям, не являющимся продуцентами антибиотиков, например к *Mycobacterium* sp. (путь 2A на рисунке 7), с последующей передачей клиническим патогенам вероятнее всего через нескольких носителей (путь 2B на рисунке 7). Но возможно, что наиболее важный путь может включать прямой перенос генов устойчивости от бактерий окружающей среды (обнаруженных в водоемах, аквакультуре, домашнем скоте, дикой природе и растениях) к клиническим изолятам (путь 3 на рисунке 7) (Aminov, Mackie, 2007; Peterson, Kaur, 2018). Действительно, гены устойчивости гораздо более широко распространены в непатогенных микробных популяциях окружающей среды, чем первоначально предполагалось (Surette, Wright, 2017). Так 500 штаммов *Streptomyces* ssp., выделенных из почвы, были проверены на устойчивость к 21 антибиотику и каждый из этих штаммов оказался мультирезистентным к 7-8 антибиотикам из 21 протестированных, что указывает на ши-

рокое распространение механизмов резистентности к антимикробным веществам у современных микроорганизмов (D'Costa et al., 2006).

Анализ последовательностей генома, проведенный в последние годы, также показал, что не только механизмы внутренней резистентности широко распространены у микробов (Cox, Wright, 2013), но и что гомологи детерминант резистентности клинических изолятов обычно присутствуют у непатогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий (Mukhtar et al., 2001; Sugantino, Roderick, 2002). Наконец, имеются убедительные доказательства того, что последовательности генов устойчивости к антибиотикам являются древними и предшествуют практическому использованию антибиотиков (D'Costa et al., 2011; Kashuba et al., 2017).

3.7. Развитие устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов

Повсеместное и неконтролируемое использование антибиотиков привело к отбору устойчивых штаммов к каждому применяемому антибиотику (Ogawara, 2016). После введения метициллина для лечения устойчивых к пенициллину инфекций, вызванных *S. aureus*, устойчивость стала возрастать у штаммов этой бактерии, которые теперь называются MRSA (Davies, 2010). Это говорит о чрезвычайной пластичности бактериальных геномов и их огромном потенциале адаптации. Высокая частота спонтанных мутаций и широко распространенные механизмы обмена ДНК у бактерий являются решающими факторами, способствующими возникновению этого явления. В последнее время развитие множественной и широкой лекарственной устойчивости у штаммов *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* стало причиной серьезной обеспокоенности. Такие штаммы, обладающие сверхустойчивостью и повышенной вирулентностью, обычно называют «супербактериями» (Miller et al., 2014). Скорость развития резистентности различается в зависимости от вида бактерий, селективного давления, воздействия противомикробных агентов, а также возможности передачи генов резистентности к бактериям из геномов других бактерий (van Duijkeren et al., 2017; Peterson, Kaur, 2018).

3.8. Роль горизонтального переноса генов в передаче устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов.

Многие гены устойчивости давно развились в естественных условиях без антропогенного воздействия, но в настоящее время эти гены быстро распространяются среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Горизонтальный перенос генов осуществляется тремя хорошо изученными генетическими механизмами: трансформация (бактерии поглощают ДНК из окружающей среды), конъюгация (бактерии напрямую переносят гены в другую клетку) и трансдукция (бактериофаги перемещают гены из одной клетки в другую) (Hu et al., 2017).

Все гены, а не только те, которые вызывают лекарственную устойчивость, могут передаваться горизонтальным переносом генов и культивироваться путем естественного отбора, включая детерминанты вирулентности (Barlow, 2009). Так стрептококки могут стать естественно компетентными и, таким образом, эффективно участвовать в трансформации, тогда как энтеробактерии обычно используют конъюгативные плазмиды для обмена генетической информацией. Трансформация чаще всего наблюдается у Гр⁺ *Streptococcus pneumoniae* и *B. subtilis*, хотя многие грамотрицательные бактерии также становятся компетентными (Johnston et al., 2014). Факторы, которые контролируют компетентность, обычно включают пищевой статус бактерии (Claverys et al., 2006) и экологические стрессоры, такие как антибиотики или агенты, повреждающие ДНК (Prudhomme et al., 2006). Хотя физиологическая роль трансформации все еще обсуждается и считается, что ее основной целью является репарация ДНК или генетическая диверсификация для повышения адаптивности (Johnston et al., 2014), но трансформация, видимо сыграла важную роль в эволюции представителей таких устойчивых к антибиотикам родов бактерий как *Streptococcus* и *Neisseria*. Считается, что сохранение устойчивости к пенициллину у *S. pneumoniae* может быть связано с высокой частотой естественной трансформации в этом организме (Hoffman-Roberts et al., 2005).

3.9. Механизмы устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов бактерий

Как известно, невосприимчивость бактерий к антимикробным агентам может быть обусловлена внутренней и/или приобретенной устойчивостью (Cassir et al., 2015; Schwarz et al., 2017). Внутренняя резистентность, также известная как первичная или врожденная резистентность, описывает состояние общей нечувствительности бактерий к определенному противомикробному агенту или классу агентов. Внутренние механизмы действия антибиотиков обычно кодируются хромосомами и включают неспецифические насосы оттока (которые, вероятно, развились как общая реакция на токсины окружающей среды), ферменты, инактивирующие антибиотики, или механизмы, которые служат барьерами проницаемости (Cox, Wright, 2013). Эти механизмы заложены в основной генетической структуре организма. Устойчивость к ванкомицину у *E. coli* и других Гр⁻ бактерий является примером внутренней устойчивости, которая возникает в результате работы барьера проницаемости, создаваемого внешней мембраной (Arthur, 1993). Хорошо изученной системой внутренней резистентности является откачивающий насос AcrAB/TolC у *E. coli*, который обладает очень широкой субстратной специфичностью и может откачивать из клеток различные классы антибиотиков, красителей, детергентов и дезинфицирующих средств (Nikaido, Takatsuka, 2009).

Приобретенная (адаптивная, вторичная) устойчивость возникает в результате контакта микроорганизма с антимикробным средством в результате возникновения мутаций хромосомной ДНК, модифицирующих белки бактерий, либо за счет трансформации, благодаря которой образуются мозаичные гены, либо путем горизонтального переноса генов (ГПГ) устойчивости, например с помощью плазмид. Механизмы приобретенной резистентности часто включают кодируемые плазмидой специфические насосы оттока (например, такие, как TetK и TetL у *S. aureus*) и ферменты, которые могут модифицировать антибиотик или мишень антибиотика (van Hoesk et al., 2011). Механизмы приобретенной устойчивости представляют более серьезную угрозу для здоровья человека, в частности, из-за изменения детерминанты резистентности с хромосомной на плазмидно-опосредованную, что приводит к усиленной экспрессии и распространению генов устойчивости в популяциях (Martinez, 2018).

Можно выделить три основных типа механизмов резистентности у бактерий: (1) ферментативная инактивация путем дезинтеграции или химической модификации противомикробных препаратов, (2) снижение внутриклеточного накопления за счет уменьшения притока и/или увеличения оттока (эффлюкс) противомикробных препаратов и (3) модификация клеточной мишени путем мутации, химической модификации или защиты сайтов-мишеней, а также сверхэкспрессии чувствительных мишеней или замены чувствительных структур-мишеней альтернативными устойчивыми (Schwarz et al., 2006, 2017).

3.9.1. Ферментативная модификация и дезинтеграция антибиотиков

Наиболее распространены механизмы инактивации антибиотиков с помощью ферментов (Таблица 1). Эти механизмы разнообразны и активны в отношении антимикробных агентов, основных классов, таких как β-лактамы, аминогликозиды и другие соединения (van Duijkeren, 2017). Процесс инактивации антибиотика происходит за счет способности ферментов, специфично связываться с антибиотиком и модифицировать его (Ramirez, Tolmasky, 2010; Schwarz et al., 2017). Так хлорамфеникол и его производное фторфеникол представляют собой высокоэффективные ингибиторы биосинтеза бактериальных белков. Этот антибиотик может быть ацетилирован у многих Гр⁺ и Гр⁻ бактерий ферментами группы ацетилтрансфераз (хлорамфениколацетилтрансферазы) (Schwarz et al., 2004).

Таблица 1. Примеры устойчивости к противомикробным препаратам путем ферментативной инактивации (van Duijkeren, 2017).

Resistance mechanism	Resistance gene(s)	Gene product	Resistance phenotype	Bacteria involved	Location of the resistance gene ^b
Hydrolytic degradation	<i>bla</i>	β -Lactamases	β -Lactam antibiotics	Various Gram+, Gram-, aerobic, anaerobic bacteria	P, T, GC, C
	<i>ere(A), ere(B)</i>	Esterase	Macrolides	Gram+, Gram- bacteria	P, GC
	<i>vgb(A), vgb(B)</i>	Lactone hydrolases	Streptogramin B antibiotics	<i>Staphylococcus, Enterococcus</i>	P
Chemical modification	<i>aac, aad (ant), aph</i>	Acetyl-, adenyl-, phosphotransferases	Aminoglycosides	Gram+, Gram-, aerobic bacteria	T, GC, P, C
	<i>aad (ant)</i>	Adenyltransferases	Aminoglycosides/ aminocyclitols	Gram+, Gram-, aerobic bacteria	T, GC, P, C
	<i>catA, catB</i>	Acetyltransferases	Chloramphenicol	Gram+, Gram-, aerobic, anaerobic bacteria	P, T, GC, C
	<i>vat(A-G)</i>	Acetyltransferases	Streptogramin A antibiotics	<i>Bacteroides, Staphylococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Yersinia</i>	P, C
	<i>mph(A-G)</i>	phosphotransferases	Macrolides	Gram+, Gram- bacteria	P, T, C
	<i>lnu(A-P)</i>	nucleotidyltransferases	Lincosamides	Gram+, Gram- bacteria	P
	<i>tet(X), tet(37), tet(56)</i>	oxidoreductases	Tetracyclines	Gram- bacteria, unknown, <i>Legionella</i>	T, P

3.9.2. β -Лактамамазы бактерий

Одним из типов разрушения антибиотиков, используемым клиническими штаммами бактерий, является действие на них ферментов β -актамаз. Гидролиз β -лактамных антибиотиков с помощью β -лактамаз является наиболее распространенным механизмом устойчивости против антибактериальных агентов этого класса. Так как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы включены в оптимальные схемы лечения многих инфекционных заболеваний, то наличие и характеристика этих ферментов играет решающую роль при выборе соответствующей терапии (Bush, Jacoby, 2010; Bush, 2023). Ферменты β -лактамазы играют решающую роль в устойчивости к β -лактамным антибиотикам у грамотрицательных клинических бактерий. Гр⁺ бактерии часто предпочитают механизмы устойчивости на основе пенициллинсвязывающих белков, вероятно, из-за различий в архитектуре клеточной стенки между двумя типами бактерий (Miyamoto et al., 2000).

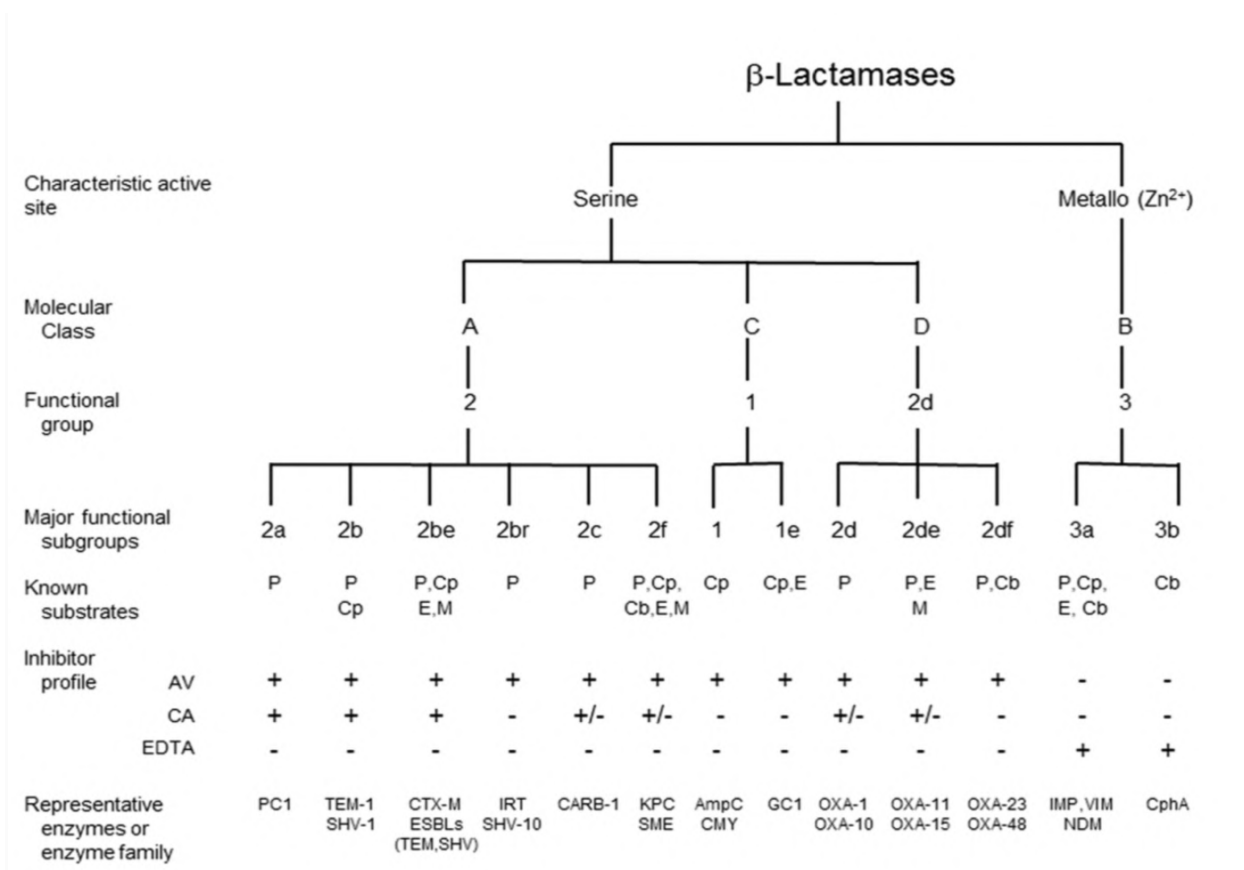


Рисунок 8. Молекулярные и функциональные взаимосвязи между лактамазами:

AV - авибактам; CA - клавулановая кислота; Cb - карбапенем; Cp - цефалоспорин; E - цефалоспорин расширенного спектра действия; M - монобактам; P - пенициллин (Bush, 2018).

β-Лактамазы найдены у многих бактерий. Это универсальные ферменты, способные гидролизовать химические соединения, содержащие лактамное кольцо. Как показано на рисунке 8 (Bush, 2018), данные ферменты разделены на два подразделения в соответствии с механизмом, с помощью которого они осуществляют гидролиз – путем образования стабильного комплекса фермента с серином в активном центре или посредством гидролитической реакции с двумя ионами цинками в активных центрах металло-лактамаз (МБЛ) (Zhang, Hao, 2011). На основе размера молекулы и гомологии между аминокислотными последовательностями активного центра β-лактамазы разделены на четыре молекулярных класса, A, B, C и D (Huovinen et al., 1988). В настоящее время выделяют 17 основных функциональных групп β-лактамаз, входящих в четыре молекулярных класса (Bush, Jacoby, 2010; Bush, 2018). Дальнейшая дифференциация этих ферментов возможна на основе реакций с ингибитором лактамаз класса A клавулановой кислотой (Reading, Cole, 1977), ингибитором серин-лактамаз широкого спектра действия авибактамом (Stachyra et

al., 2010) и хелатором ионов металлов EDTA для идентификации МБЛ (Saino et al., 1982). МБЛ сгруппированы в соответствии со сходством последовательностей и координацией цинка в три подкласса: В1, В2 и В3. В эти подклассы входят ферменты разных семейств. Так к подклассу В1 относятся ферменты семейств BcII, CcrA, IMP-1, BlaB, SPM-1, VIM-2 и NDM-1 (Karsisiotis et al., 2013; Bush, 2018). Общее количество всех уникальных лактамаз, принадлежащих к более 20 семействам и 4 классам, в настоящее время составляет около 2800. Из клинических изолятов идентифицированы уже более 1000 β -лактамаз, и это число продолжает расти постоянно из-за новых мутаций в активном центре этих ферментов, позволяющих им адаптироваться к новым β -лактамам (Bush, 2018). Примером может служить эволюция фермента TEM-3, который может разрушать цефалоспорины 3-го поколения, что помещает его в категорию β -лактамаз расширенного спектра действия и доказывает быструю эволюцию генов β -лактамаз у клинических штаммов (Paterson, Bonomo, 2005). Большинство генов β -лактамаз переносятся с помощью мобильных генетических элементов, что способствует их быстрому распространению в популяциях бактерий; однако некоторые гены β -лактамаз также обнаружены в хромосомах представителей семейства Enterobacteriaceae, где они слабо экспрессируются и функционируют как молчащие гены (Martinez, 2018).

3.9.2.1. β -Лактамазы грамположительных бактерий

B. cereus, *B. anthracis* и *B. licheniformis* являлись одними из первых объектов биохимических исследований β -лактамаз, на результатах которых были основаны будущие исследования β -лактамаз и их классификация (Bush, 2018). Когда были охарактеризованы четыре молекулярных класса β -лактамаз А, В, С и D на основе размера молекулы и гомологии между аминокислотными последовательностями активного центра, то считалось, что ферменты класса D существуют только у грамотрицательных бактерий. Но недавно ферменты класса D были обнаружены у *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. atrophaeus* (Stewart et al., 2020). Устойчивость к β -лактамам у Гр+ бактерий может быть опосредована несколькими механизмами. И логично, что первой линией защиты Гр+ бактерий от пенициллинов могло быть действие пенициллин-связывающих белков. Этот вариант защиты действительно эффективно использовался некоторыми грамположительными бактериями, у которых основным механизмом устойчивости к пенициллинам было приобретение РВРs со сниженным сродством к обычным β -лактамам (Fisher, Mobashery, 2016). Однако другая стратегия резистентности наблюдалась у *S. aureus* (MRSA), у которого в ответ на применение пенициллина в качестве начальных механизмов устойчивости к этому антибиотику было действие пенициллиназы или β -лактамазы, гидролизующих пенициллин (Hartman, Tomasz, 1984). И только через 20 лет использования пенициллина в качестве лекарственного сред-

ства у *S. aureus* было обнаружено в качестве защиты действие пенициллин-связывающих белков (Hartman, Tomasz, 1984). Но присутствие пенициллиназы в качестве защиты от действия пенициллина установлено у многих бактерий. Так исследование клинических изолятов *S. aureus* в США показало, что 86,5% чувствительных к метициллину стафилококков содержат ген пенициллиназы blaZ (Richter et al., 2016). Пенициллиназа также была обнаружена у нескольких клинических изолятов *Enterococcus faecalis* еще в 1980-х годах с идентичными или близкими гомологичными аминокислотными последовательностями стафилококковых пенициллиназ, что свидетельствует о ее происхождении именно от стафилококков (Zscheck, Murray, 1991). А в одной из английских больницы процент стафилококков, продуцирующих пенициллиназу, увеличился с 14% в 1946 году до 80% в 1953 году (Medeiros, 1997).

3.9.2.2. β -Лактамазы грамотрицательных бактерий

Гидролиз β -лактамных антибиотиков с помощью β -лактамаз является наиболее распространённым механизмом устойчивости против антибактериальных агентов этого класса. Так как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы включены в оптимальные схемы лечения многих инфекционных заболеваний, наличие и характеристика этих ферментов играет решающую роль при выборе соответствующей терапии. Пенициллиназы, кодируемые плазмидами, впервые были обнаружены у грамположительных стафилококков, и гены, кодирующие эти ферменты, легко переносились только в штаммы грамположительных энтерококков, у которых был показан ген стафилококковой пенициллиназы (Murray, Mederski-Samaroj, 1983). Однако затем и у Гр- бактерий было показано, что именно горизонтально переносимые генетические элементы, кодирующие широкий спектр β -лактамаз, являются наиболее распространенным механизмом возникновения устойчивости к β -лактамам у этих бактерий. Гены, кодирующие β -лактамазы, могут быть приобретены горизонтально в основном путем приобретения плазмиды. Однако механизмы мобилизации генов у грамотрицательных бактерий могут включать и такие генетические элементы, как транспозоны, генные кассеты, интегроны и инсерционные последовательности (Brolund, Sandegren, 2016; Mathers, 2016).

3.9.3. Система оттока (эффлюкс)

Для бактерий описан ряд эффлюксных насосов, ответственных за вывод ксенобиотиков, в том числе противомикробных препаратов, из бактериальной клетки. Это, в свою очередь, ведет к невозможности накопления антибиотика в клетке в ингибирующем количестве, что позволяет бактериям выживать при более высоких концентрациях антибиотика (Schindler, Kaatz, 2016). В настоящее время эффлюксные насосы разделены на семь семейств (Рисунок 6). Насосы также разделены на две группы: первичные и второстепенные

транспортеры. Семейство транспортеров ABC относится к первой группе, для функционирования транспортеры используют энергию гидролиза АТФ. Второстепенные транспортеры включают семейства MFS, SMR, RND, PACE и MATE, которые функционируют за счет электрохимического потенциала мембраны (Baranova, Elkins, 2016; Foster, 2017; Henderson et al., 2021). RND-переносчики включают в себя три различных белковых компонента, способных к быстрой сборке в функциональный комплекс. В комплексе, где внутримембранный протон/субстрат антипортер функционирует в качестве двигателя, происходит активный транспорт субстрата через эффлюкс канал, который находится во внешней мембране. Якорные белки обладают свойствами, содействующими повышению физической активности насоса (Zgurskaya, 2002; Li et al., 2010).

Каждое семейство имеет характерную консервативную последовательность аминокислот. MFS является самым большим и самым разнообразным семейством вторичных транспортеров, известных на сегодняшний день. Семейство характеризуется различным количеством трансмембранных сегментов, причем некоторые из систем оттока имеют 12, а другие 14 трансмембранных областей. Основным механизмом резистентности грамотрицательных бактерий к антибиотикам является повышенная активность эффлюкс-насосов семейства RND, которые включают три компонента:

- Во внутренней мембране находится протонный антипортер.

- Во внешней мембране находится эффлюкс-канал по которому субстраты транспортируются через пептидогликан и непосредственно через внешнюю оболочку.

- Во внутренней мембране находится якорный адаптер белка (Marquez, 2005; Biswas et al., 2008; Li et al., 2010).

Экспрессия генов эффлюксных насосов является сложным процессом и регулируется как локально кодируемыми регуляторами, так и многочисленными глобальными регуляторами, которые также влияют на экспрессию других генов.

У бактерий гены, кодирующие эффлюксные белки, находятся в хромосомах или плазмидах, поэтому способны передаваться в результате горизонтального переноса. А возникающие мутации приводят к повышенной экспрессии генов, кодирующих эффлюкс-насосы для выведения из клетки часто нескольких препаратов (Baranova, Elkins, 2016). У представителей рода *Bacillus* обнаружены насосы всех известных семейств (Hassan et al., 2017). Изучение структуры эффлюкс-насосов у бактерий группы *B. cereus*, три из которых – *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* являются патогенами людей, животных и насекомых, показало, что у штаммов этих видов функционирует соответственно по 93, 93 и 103 системы эффлюкса из всех известных семейств. Однако большинство идентифицированных систем оттока антибиотиков были классифицированы в пределах семейств MFS (бо-

лее 50 насосов у каждого из трех штаммов) или ABC (до 35 транспортных систем) и всего от 3 до 5 эффлюкс-насосов каждого из семейств RND, MATE и SMR (Таблица 2) (Baranova, Elkins, 2016; Hassan et al., 2017). Следовательно, эффлюкс-насосы, по-видимому, особенно распространены в геномах группы *B. cereus*, но на сегодняшний день функционально охарактеризовано относительно мало этих переносчиков. Напротив, *B. subtilis* кодирует одни из наиболее хорошо охарактеризованных насосов оттока нескольких лекарственных препаратов у бактерий, включая транспортеры Bmr и Blt из суперсемейства основных фацилитаторов MFS (Kumano et al., 2003). Белки MFS являются древним семейством белков, встречаются во всех микроорганизмах и участвуют в широком спектре транспортных реакций, включая поглощение основных питательных веществ и отток токсичных соединений (Paulsen et al., 1996).

3.9.4. Модификация мишени

Большинству антибиотиков для подавления патогенного микроорганизма необходимо осуществить специфическое связывание с мишенью действия. Это может усложняться в результате изменения структуры мишени действия и антибиотик не способен к эффективному связыванию. Как правило, подобные изменения опосредуются спонтанными мутациями. Изменение структуры мишени действия препятствует эффективному связыванию с антибиотиком, но по-прежнему позволяют выполнять свою нормальную функцию. В обычной ситуации антибиотик способен прочно связываться со специфичной мишенью и оказывать подавляющее действие. Мутация сайта-мишени (пример: мутаций в генах топоизомеразы, которые ведут к возникновению устойчивости к фторхинолонам) или рекомбинация, ведущая к изменению положения гена (мозаичная аллель) – оба эти механизма, ведут к уменьшению сродства между антибиотиком и мишенью его действия, вследствие чего антибиотик не способен эффективно связаться с мишенью. Модификация мишени путем добавления химической группы также ведет к предотвращению связывания антибиотика без изменения первичной последовательности белка мишени (Roberts et al., 1999; Hooper, 2000; Poehlsgaard, 2005; Nikaido, 2009; Kohanski et al., 2010).

Таблица 2. Количество предполагаемых систем выведения лекарств, закодированных в геномах штаммов группы *B. cereus* и других Firmicutes (Hassan et al., 2017).

Штамм	Эффлюксные семейства					
	ABC	MFS	MATE	SMR	RND	Total %
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	28a	51	4	5	4	93
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28	53	4	4	3	93
<i>Bacillus thuringiensis</i> konkukian	35	53	4	5	5	103
<i>Bacillus megaterium</i> QMB155	30	40	4	4	6	84
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR032	23	30	4	3	4	64
<i>Bacillus subtilis</i> 168	20	39	4	4	4	71
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	16	22	1	1	2	42
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	16	8	10	0	1	35
<i>Listeria monocytogenes</i> La111	27	23	9	1	3	63
<i>Listeria innocua</i> Clip11262	31	18	6	1	2	58
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG802	20	11	2	2	3	38

Классический пример модификации мишени наблюдается у штаммов *S. aureus* MRSA, где устойчивость к β -лактамам обеспечивается экзогенным пенициллин-связывающим белком, известным как PBP2a, чей транспептидазный домен нечувствителен к действию нескольких различных β -лактамов (Fishovitz et al., 2014; Liu et al., 2016).

Устойчивость к ванкомицину у энтерококков опосредована функционированием группы генов *van*, которые кодируют биохимический механизм, реконструирующий синтез пептидогликана посредством замены D-Ala на D-лактат, что приводит к высокому уровню устойчивости, или замены на D-серин, что приводит к низкой устойчивости. Замена D-Ala на D-лактат удаляет одинарную водородную связь между молекулой ванкомицина и его мишенью (фрагмент D-Ala-D-Ala), снижая сродство антибиотика к предшественнику приблизительно в 1000 раз. На сегодняшний день описано девять различных *van*-кластеров (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* и *vanN*) связанных с энтерококками (Miller et al., 2014; Munita et al., 2016).

Одним из наиболее изученных примеров механизма защиты мишени действия антибиотика являются детерминанты устойчивости к тетрациклинам TetM и TetO. Эти белки принадлежат к надсемейству факторов трансляции ГТФаз и действуют как гомологи фак-

торов элонгации (EF-G и EF-Tu), участвующих в синтезе белка. TetO и TetM взаимодействуют с рибосомой и вытесняют тетрациклин из сайта связывания ГТФ-зависимым образом. TetM непосредственно вытесняет и высвобождает тетрациклин из рибосомы посредством взаимодействия между доменом IV 16S рРНК и сайтом связывания тетрациклина. Это взаимодействие изменяет конформацию рибосомы, предотвращая повторное связывание антибиотика. TetO в свою очередь конкурирует с тетрациклином за одно и то же рибосомное пространство и изменяет геометрию сайта связывания антибиотика, вытесняя антибиотик из рибосомы и позволяя тем самым возобновить синтез белка (Munita et al., 2016).

3.9.5. Изменение проницаемость мембран

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий выступает в роли селективного барьера, который можно сравнить с молекулярным ситом, где поглощение большинства гидрофильных молекул осуществляется через заполненные водой каналы, представляющие собой гидрофильные поры, образованные белками поринами. Для того чтобы антибиотик проник в бактериальную клетку, он должен иметь определенный размер и заряд, что имеет критическое значение при переходе через пориновый канал (Nikaido, 2001). Гидрофильные молекулы, такие как β -лактамы, тетрациклины и некоторые фторхинолоны, особенно зависят от изменений, связанных с проницаемостью внешней мембраны, поскольку данные антибиотики используют порины для проникновения внутрь бактериальной клетки. Врожденная низкая чувствительность *P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* к β -лактамам (по сравнению с Enterobacteriaceae) частично связана с уменьшенным количеством и/или дифференциальной экспрессией поринов (Alekshun et al., 2007; Delcour, 2009; Li et al., 2012).

Описано несколько типов поринов, их можно классифицировать в соответствии с их структурой (тримерные или мономерные) и с уровнем селективности. Среди наиболее изученных поринов есть три основных белка, обнаруженных у *E. coli* (OmpF, OmpC и PhoE), которые являются классическими примерами порин-опосредованной устойчивости к антибиотикам. Основным порином наружной мембраны (на примере бактерии *Ps. aeruginosa*) является белок OmpF, который, помимо участия в неспецифической диффузии, задействован в процессе адгезии и образования биопленки в анаэробных условиях (Delcour, 2009). Изменения в функционировании поринов чаще всего связаны с изменением типа экспрессируемых поринов, изменением уровня экспрессии поринов и нарушениями в функционировании поринов. Изменения проницаемости, связанные с любым из этих механизмов, часто приводят к резистентности низкого уровня и, как правило, функционируют

совместно с другими механизмами резистентности, например такими, как повышенная экспрессия эффлюксных насосов (Nikaido, 2003; Delcour, 2009; Munita et al., 2016).

Изучение клинических изолятов *K. pneumoniae* до и после антимикробной терапии показало, что изоляты после терапии демонстрируют сдвиг в экспрессии поринов от OmpK35 до OmpK36. Это изменение в типе экспрессируемых поринов напрямую коррелирует с 4-8-кратным снижением чувствительности к широкому спектру β -лактамовых противомикробных препаратов у исследуемых изолятов (Munita et al., 2016).

3.9.6. Метаболические шунты

Ярким примером возникновения резистентности, опосредованной формированием метаболического шунта, является устойчивость, возникающая у энтерококков к ванкомицину. Ванкомицин и родственные гликопептиды являются препаратами для лечения тяжелых инфекций, вызванных грамположительными бактериями, такими как *Enterococcus*, *S. aureus* и *Clostridium difficile* (Stogios et al., 2020). Резистентность к ванкомицину высокого уровня (МИК от 64 до 1000 мг/л) была впервые обнаружена в 1986 г., через 30 лет после первого клинического применения ванкомицина, когда были выделены устойчивые к ванкомицину энтерококки. Детерминанты устойчивости у этих штаммов были закодированы в транспозоне на плазмиде, что повысило вероятность распространения устойчивости к ванкомицину среди Gr^+ видов посредством горизонтального переноса генов. Позже приобретенная устойчивость к ванкомицину была обнаружена у *S. aureus*, *C. difficile*, *Streptococcus bovis* и многих других видов бактерий (Nikaido, 2009; Stogios et al., 2020).

На данный момент известно о двух механизмах резистентности к ванкомицину, которые широко распространены в настоящее время. Ванкомицин образует сложную сеть водородных связей с областью d-Ala-d-Ala липида II, препятствуя процессу синтеза пептидогликанового слоя. Устойчивость к ванкомицину включает деградацию этого природного предшественника и его замену альтернативами d-Ala-d-lac или d-Ala-d-Ser, к которым ванкомицин имеет низкое сродство (Evers et al., 1996; Courvalin, 2006; Nikaido, 2009; Stogios et al., 2020).

Глава 4. Генетические детерминанты резистентности к антибиотикам у бацилл

4.1. Гены, кодирующие механизмы эффлюкса

Ген *blt*. Эффлюксные насосы являются активными белковыми транспортерами, локализованными в цитоплазматической мембране клетки и требующими химической энергии для выполнения своей функции. Первичные транспортеры в качестве источника энергии используют гидролиз АТФ, тогда как у вторичных транспортеров транспорт связан с электрохимической разностью потенциалов, создаваемой закачкой ионов водорода или

натрия. Бактериальные помпы получили известность в патогенезе инфекционных болезней человека и животных, поскольку они помогают бактериям защитить себя от противомикробных препаратов, используемых для борьбы с ними. В последнее время появляются также данные о том, что эффлюксные насосы играют важную, но плохо изученную, экологическую и физиологическую роль в природных экосистемах. Об этом свидетельствует их эволюционная консервативность на уровне последовательностей ДНК и белков. Откачивающие насосы обычно кодируются хромосомами и в значительной степени являются частью «основного генома» (coregenome), хотя многие из них, видимо не являются необходимыми для обеспечения роста бактерий. Отсутствие специфичных природных субстратов для многих классов эффлюкс-систем усложняет понимание их физиологической роли. Гены эффлюксных насосов могут быть приобретены также посредством горизонтального переноса генов (Henderson et al., 2021; Moore-Machacek et al., 2023). Гены, кодирующие эти функционально и структурно разнообразные системы эффлюксных насосов, широко распространены в микробном мире, при этом у каждого вида или штамма может функционировать одновременно большинство семейств насосов (Henderson et al., 2021).

Благодаря тому, что у многих эффлюксных насосов отсутствует строгая специфичность к субстрату, один насос может откачивать множество структурно сходных соединений, таких, например, как бактериальные вторичные метаболиты, что позволяет предотвратить внутриклеточное накопление токсичных метаболитов (Blanco et al., 2016). Способность вытеснять экзогенные токсичные субстраты, возможно, является ключевой естественной ролью эффлюкса. Например, бактерии способны выводить из клетки самые разнообразные субстраты, которые в противном случае были бы токсичными для клетки, такие как биоциды, тяжелые металлы, органические загрязнители, а также противомикробные препараты, синтезируемые другими микробами, находящимися поблизости, или применяемые клинически (Henderson et al., 2021). Эффлюксные насосы имеют у бактерий важное значение для поддержания цитоплазматического гомеостаза pH, что, в свою очередь, обеспечивает функциональность откачивающих насосов за счет поддержания протондвижущей силы и функции ключевых метаболических ферментов. При экстремальных изменениях pH (например, в кишечнике млекопитающих, в кислых, щелочных озерах и т. д.) экспрессия эффлюксных насосов и других систем модулируется, чтобы обеспечить стабильность мембран, проницаемость и гомеостаз. У видов, обитающих в суровых условиях, откачивающие насосы обеспечивают устойчивость к изменению pH, а в некоторых случаях даже кислотоустойчивость (Blanco et al., 2016).

Эффлюксные насосы разделены на семь семейств (Рисунок 6) – ABC, RND, MFS, SMR, MATE, PACE и AbgT (Henderson et al., 2021). У представителей рода *Bacillus* обна-

ружены насосы всех известных семейств (Hassan et al., 2017). Так *B. subtilis* обладает двумя гомологами эффлюксного транспортера MFS-типа: *Vmr* и *Blt*. Оба являются переносчиками, связанными с множественной лекарственной устойчивостью, способными откачивать антибиотики группы фторхинолонов, а также некоторые молекулы, не относящиеся к антибиотикам, например, красители и ингибиторы (Ahmed et al., 1995). При этом показано, что сверхэкспрессия переносчика *Blt* у *B. subtilis* придает фенотип множественной лекарственной устойчивости, но в основном обеспечивает отток в среду встречающегося в природе полиаминового соединения спермидина, что является естественной функцией *Blt* (Poole, 2000; Fleeman et al., 2018). Откачивающий насос *Blt* у *B. subtilis* играет важную физиологическую роль в оттоке спермидина видимо в результате того, что ген *blt* кодируется рядом с геном полиаминацетилтрансферазы, что и способствует оттоку спермидина (Hassan et al., 2017). Эффлюксный транспортер *Blt* способствует развитию лекарственной устойчивости к фторхинолонам только у мутантных штаммов, показывающих повышенную экспрессию гена *blt*. Ген *blt* положительно регулируется продуктом гена *bltR*, хотя субстраты откачивающего насоса *Blt* не индуцируют экспрессию *blt* и не связываются с белком *BltR* (Ahmed et al., 1995). Таким образом, у *B. subtilis* экспорт противомикробных препаратов может быть основной функцией транспортера *Vmr*, тогда как ген *blt* и белок *Blt* играют важную физиологическую роль только в экспорте полиаминов и вторичную роль в откачке фторхинолонов (Baranova et al., 1999; Poole, 2000).

Гены *ykkCD*. Транспортеры, относящиеся к семейству малых помп с множественной лекарственной устойчивостью (SMR), обеспечивают экспорт или поглощение лекарств, сахаров, аминокислот и других метаболитов и представляют собой самые маленькие из известных на сегодняшний день откачивающих насосов. Полная транспортная система SMR состоит из двух полипептидов, каждый длиной примерно 110 аминокислот, и может быть гомо- или гетеродимером. Полный транспортер *YkkCD* представляет собой откачивающий насос, придающий устойчивость к ряду антибиотиков и биоцидов (Hassan et al., 2017).

Анализ генома *B. subtilis* показал, что эта бактерия кодирует семь гомологов семейства SMR. Шесть из этих гомологов спарены в три различных оперона, и совместная экспрессия у *E. coli* одного такого оперона, *ykkCD*, но не экспрессия только *ykkC* или *ykkD*, приводит к развитию фенотипа с множественной лекарственной устойчивостью. Гены *ykkC* и *ykkD* *B. subtilis*, а также пару генов *ykkCD* клонировали в вектор экспрессии pBAD24. Когда гены *ykkC* и *ykkD* экспрессировались вместе в штамме *E. coli* DH5 α , наблюдался фенотип МЛУ широкого спектра действия. Совместная экспрессия генов *ykkC* и *ykkD* привела к более, чем 20-кратному повышению МИК многих протестированных со-

единений и к 100-кратному повышению МИК пиронина Y и фосфономицина (Jack et al., 2000).

Гены *bcrA*, *bcrB* и *bcrC*. Бацитрацин – полипептидный антибиотик, синтезируемый штаммами бактерии *B. subtilis*. Он ингибирует синтез клеточной оболочки бактерий и используется в клинической практике в сочетании с другими противомикробными препаратами. Существует два основных механизма устойчивости к бацитрацину: транспортер BcrABC, относящийся к суперсемейству АТФ-связывающих кассет (ABC), который откачивает бацитрацин, и VasA ундекапrenoкиназа, которая генерирует C55-изопренилфосфат путем синтеза *de novo* и, таким образом, компенсирует ингибирование бацитрацином ферментативного дефосфорилирования C(55)-изопренилпирофосфата с образованием C55-изопренилфосфата. Гены устойчивости к бацитрацину *bcrA*, *bcrB* и *bcrC* кодируют АТФ-связывающие кассетные транспортеры (АТР-binding cassette, ABC) обычно участвующие в транслокации родственных им субстратов, которые управляются гидролизом АТФ. Переносчик BcrABC обеспечивает иммунитет к синтезирующему бацитрацин штамму *B. licheniformis* (Podlesek et al., 2000). В этой системе белки BcrB и BcrC образуют трансмембранный канал, а два белка BcrA функционируют как АТФазы, обеспечивая энергию для транспорта. Двухкомпонентная регуляторная система VasRS была идентифицирована как регулятор экспрессии *bcrABC* (Podlesek et al., 2000; Cao et al., 2002).

Ген устойчивости к бацитрацину *bacA* был впервые идентифицирован у *E. coli*. Гомологи VasA были также идентифицированы у *S. pneumoniae* и *S. aureus* и важны для устойчивости к бацитрацину, предположительно за счет увеличения синтеза C55-изопренилфосфата (Chalker et al., 2000; Podlesek et al., 2000). Следует отметить, что механизм устойчивости к бацитрацину, обеспечиваемый переносчиками Bcr, универсален – он одинаково функционален как у *B. subtilis*, так и у кишечной палочки (Podlesek et al., 2000).

Следовательно, такие гены эффлюкса у бактерий рода *Bacillus*, как *bcrA*, *bcrB*, *bcrC*, *ykkC*, *ykkD* и *blt*, играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как устойчивость к антибиотикам, формирование биопленки и механизмы реагирования на стресс. Эти гены кодируют компоненты насосов или транспортных систем, которые могут выкачивать из клетки широкий спектр веществ, тем самым обеспечивая устойчивость к токсичным соединениям и антибиотикам, способствуя вирулентности и влияя на физиологию клетки в ответ на внешние стрессы. Понимание функционирования этих систем играет важную роль для разработки новых терапевтических стратегий и контроля бактериальной резистентности.

4.2. Гены, кодирующие инактивацию антибиотиков

Гены TEM. Бета-лактамы антибиотики, включая пенициллины и цефалоспорины, являются одними из наиболее широко используемых антибактериальных средств. Основным механизмом устойчивости к этим антибиотикам у бактерий является продукция β -лактамаз, которые гидролизуют β -лактамное кольцо, делая антибиотик неэффективным. Семейство ферментов β -лактамаз является одними из наиболее распространенных и хорошо изученных групп ферментов, связанных с устойчивостью к антибиотикам (Bush, 2023). Ранее полагали, что β -лактамазы связаны только с возбудителями внутрибольничных инфекций, однако теперь эти ферменты обнаружены у многих микроорганизмов из окружающей среды, в том числе у бактерий рода *Bacillus*. Некоторые специфические β -лактамазы, такие как ферменты типа TEM-, SHV- и OXA, кодируемые плазмидами, распространены повсеместно. Важно исследовать бактериальные источники и пути распространения наиболее известных и наиболее клинически значимых β -лактамаз, чтобы обеспечить эффективное использование β -лактамных антибиотиков в различных географических точках и медицинских учреждениях (Bush, Bradford, 2020).

Как известно, β -лактамы антибиотики действуют путем ингибирования транспептидаз – ферментов, которые участвуют в биосинтезе клеточных стенок бактерий, а β -лактамазы бактерий инактивируют β -лактамы антибиотики путем гидролиза их β -лактамного кольца. β -лактамазы расширенного спектра действия (ферменты CTX-M, TEM и SHV-типа), относящиеся к классу А группы 2 по классификации Bush-Jacobi (Bush, Jacoby, 2010), способны гидролизовать пенициллины первого, второго и третьего поколений, цефалоспорины и монобактамы. Они кодируются генами, расположенными на плазмидах, которые передаются путем конъюгации преимущественно между грамотрицательными видами бактерий.

Карбапенемазы способны гидролизовать практически все β -лактамы антибиотики, включая карбапенемы. Их подразделяют на разные молекулярные классы (А, В и D), а также на группы 2 и 3 (Bush, Jacoby, 2010). Большинство карбапенемаз в основном описаны у *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Металло- β -лактамазы, относящиеся к классу В группы 3, можно разделить на те, которые кодируются плазмидами или связаны с хромосомами. Последние встречаются преимущественно у Gr⁺ или Gr⁻ палочек и анаэробных бактерий (Bush, Jacoby, 2010; Bush, Bradford, 2020).

Одними из первых объектов биохимических исследований β -лактамаз, на результатах которых была основана их классификация, являлись *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. licheniformis* (Chen et al., 2003; Bush, 2018; Bush, 2023). Были описаны четыре молекулярных класса β -лактамаз (А, В, С и D) на основе размера молекулы и гомологии между ами-

нокислотными последовательностями активного центра. Ферменты класса D обнаружены у бацилл недавно. Это *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. atrophaeus* (Stewart et al., 2020).

Ген *TEM-116*. Гены *TEM* кодируют один из наиболее распространенных типов β -лактамаз. Впервые идентифицированы у штаммов *E. coli*, но последующие исследования показали их присутствие и в бактериях других родов, включая *Bacillus* (Bush, Bradford, 2020). Наличие генов *TEM* у *Bacillus* sp., как и у других Гр⁺ бактерий, указывает на их потенциальную устойчивость к β -лактамам антибиотикам. Эти бактерии, например *B. subtilis*, обычно встречаются в почве, где подвергаются действию естественных антибиотиков, синтезируемых другими микроорганизмами, что, вероятно, способствовало развитию механизмов их устойчивости. Показано, что β -лактамазы *TEM* могут быть различными по своей структуре и спектру действия в зависимости от конкретного гена и его мутаций. Некоторые из этих ферментов способны гидролизовать и расширенный спектр β -лактамов, включая новейшие цефалоспорины и карбапенемы, что делает их особенно опасными с точки зрения клинической микробиологии.

Ген *TEM-116* кодирует клинически значимую β -лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС), которая относится к повсеместно распространенному семейству ферментов, способных придавать устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином первого, второго и третьего поколений, а также подавляться ингибиторами β -лактамаз, такими как клавулановая кислота (Naidoo et al., 2020). 400 вариантов лактамаз *TEM*, которые были идентифицированы на данный момент, могут быть разделены на два кластера: один происходит от *TEM-1* (первый описанный белок *TEM*), а другой берет свое начало с *TEM-116*. Ген *TEM-116* содержится в конъюгативных плазмидах многих Гр⁻ бактерий. Этот ген кодирует фермент с микробиологически доказанными характеристиками БЛРС (Paterson, Bonomo, 2005). Важно отметить, что гены *TEM* не всегда однозначно приводят к высокому уровню устойчивости видов *Bacillus* к антибиотикам. Эффективность β -лактамаз, кодируемых геном *TEM-116*, может существенно варьировать в зависимости от других факторов, таких как наличие дополнительных β -лактамаз или других механизмов устойчивости, а также от специфической экспрессии гена в конкретной бактериальной клетке (Tóth et al., 2021).

Текущие исследования устойчивости *Bacillus* к β -лактамам включают генетический анализ для определения наличия генов *TEM* и β -лактамаз, а также фармакологические испытания для оценки эффективности различных ингибиторов β -лактамаз. Эти исследования не только помогают лучше понять механизмы устойчивости, но и разрабатывать новые подходы к лечению инфекций, вызванных устойчивыми к β -лактамам бактериальными штаммами.

Ген *satA*. Почва представляет собой сложную микробную нишу, занятую как прокариотами, так и эукариотами. Эта среда содержит химические вещества растительного и микробного происхождения, которые ставят под угрозу выживание микроорганизмов. Такие противомикробные агенты оказывают сильное селективное давление на микробов, заставляя их вырабатывать средства для их нейтрализации или устойчивости к ним. Почвенная бактерия *B. subtilis* выживает в окружающей среде различными способами, такими как споруляция, естественная способность приобретать генетический материал и синтез ферментов, которые могут детоксицировать противомикробные препараты. Стрептотрицин – антибиотик широкого действия, синтезируемый стрептомицетами, который действует как на Gr+, так и на Gr- бактерии. Стрептотрицин оказывает бактерицидное действие за счёт связывания с 30S субъединицей бактериальной рибосомы, что в дальнейшем приводит к угнетению синтеза белка. Известно, что фермент SatA у *B. subtilis* участвует в механизме инактивации стрептотрицина и кодируется геном *satA*. Штаммы *B. subtilis*, лишенные гена *satA*, были чувствительны к стрептотрицину. Эктопическая (аномальная) экспрессия гена *satA* восстанавливала устойчивость к стрептотрицину у штаммов *B. subtilis satA* (Bs SatA). Очищенный белок BsSatA ацетилировал стрептотрицин *in vitro* за счёт ацетил-кофермента А (ацетил-КоА). Один ацетильный фрагмент, перенесенный на стрептотрицин с помощью BsSatA, блокировал токсическое действие антибиотика из-за невозможности модифицированного антибиотика связываться с 30S субъединицей бактериальной рибосомы. Существующие данные подтверждают вывод о том, что у *B. subtilis* фермент SatA является стрептотрицин-ацетилтрансферазой (Burckhardt, Escalante-Semerena, 2017).

Гены *mphL* и *mphK*. Один из механизмов устойчивости к макролидам – эритромицину, спирамицину и другим, заключается в ферментативно катализируемой модификации этих антибиотиков. В результате изменения специфическими ферментами модифицированные макролиды больше не могут эффективно связываться с 50S рибосомой, и, следовательно, не способны оказывать антибиотическое действие. Было выявлено два класса ферментов, которые придают устойчивость к макролидным антибиотикам: макролидные фосфотрансферазы (MPNs) и макролидные эстеразы (Eres) (Baran et al., 2023). Функцией MPNs является ингибирование антибактериальной активности макролидов с 14-, 15- и 16-членными лактоновыми кольцами в результате модификации их структуры, включающей фосфорилирование гидроксильной группы, расположенной на углеродном атоме C5 антибиотической части дезоамина. Сейчас описано 15 макролидных фосфотрансфераз: MphA, MphB, MphC, MphD, MphE, MphF, MphG, MphH, MphI, MphJ, MphK, MphL, MphM, MphN, MphO. Все они кодируются генами, расположенными на хромосоме или подвиж-

ных генетических элементах. Присутствие макролидных фосфотрансфераз подтверждено у многих видов бактерий, как грамположительных, например, *Staphylococcus*, так и грамотрицательных, например, *E. coli* (Pawlowski et al., 2016).

Из пятнадцати подтипов генов *MPHs* мобильными генетическими элементами кодируются гены *mph(A)*, *(B)* и *(C)*. Эти гены обнаружены у клинических изолятов *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.* и *S. aureus*. Еще шесть *MPHs* также кодируются мобильными элементами, но они пока обнаружены только у непатогенных бактерий *Exiguobacterium* и *Brachybacterium*. Остальные шесть генов *MPHs* кодируются хромосомно у непатогенных бактерий, так гены *MPH(2')-VII* и *MPH(2')-XI* обнаружены соответственно у *Brachybacterium faecium* и *B. subtilis* 168 (Golkar et al., 2018).

Ген *mphL* является гомологом кодируемых хромосомами макролидных фосфотрансфераз (*Mphs*), которые инактивируют 14- и 15-членные макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* (Wang et al., 2015). Ферменты *Mphs* инактивируют макролид путем его модификации фосфорилированием 2'-ОН незаменимого диметиламинасахара, что предотвращает связывание антибиотика с рибосомой. Существует два функциональных кластера *Mphs* в группе бактерий *B. cereus*. *Mphs* кластера А инактивируют только 14-15-членные макролиды, в то время как *Mphs* кластера В инактивируют 14-, 15- и 16-членные соединения. Область генома, окружающая ген *mph* кластера В, связана с различными плазмидными последовательностями, что позволяет предположить, что этот ген является геном приобретенной резистентности. Напротив, ген *mph* кластера А расположен в хромосомной области, консервативной у всех изолятов группы *B. cereus*, и имеющиеся данные указывают на то, что он был приобретен на ранней стадии эволюции группы. Следовательно, ген *mphL*, инактивирующий только 14- и 15-членные макролиды и относящийся к кластеру А, можно считать геном внутренней резистентности, не связанным с плазмидными последовательностями (Wang et al., 2015; Alcock et al., 2023).

Еще один из генов макролидных фосфотрансфераз – ген *mphK*, кодирующий хромосомную макролид-фосфотрансферазу обнаружен у *B. subtilis* (Pawlowski et al., 2018; Alcock et al., 2023). Ген *mphK* является гомологом кодируемых хромосомами макролид-фосфотрансфераз (*Mphs*), которые инактивируют 14- и 15-членные макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. anthracis* (Wang et al., 2015). У *B. subtilis* ген *mphK* находится в хромосоме (Sultan et al., 2020).

Макролидные фосфотрансферазы могут обеспечивать резистентность к широкому спектру макролидных субстратов, однако это явление еще мало исследовано. Разработка новых макролидов, устойчивых к действию *Mphs*, является одним из направлений борьбы

с растущей проблемой антибиотикорезистентности. Понимание структурных основ взаимодействия Mrps с макролидами может способствовать созданию таких молекул.

Ген *aadK* Антибиотики группы аминогликозидов образуют связи с бактериальными рибосомами и нарушают биосинтез белков в клетках. Основным механизмом устойчивости микроорганизмов к аминогликозидам является модификация молекулы антибиотика бактериальными аминогликозид модифицирующими ферментами (АГМФ). Ген *aadK* кодирует фермент аминогликозид-6-аденилилтрансферазу, который модифицирует антибиотики группы аминогликозидов, включающую стрептомицин, стрептомицин, неомицин, канамицин, амикацин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин, арбекацин, нетилмицин, паромомицин и спектиномицин, делая микроорганизмы устойчивыми к их действию (Saggese et al., 2022). Наличие этого гена в хромосоме многих исследованных штаммов *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* указывает на его потенциальную важность в эволюции и адаптации данных видов бактерий к антибактериальным препаратам (Agersø et al., 2019). Устойчивость некоторых штаммов *B. subtilis* к стрептомицину обусловлена наличием гомолога гена *aadK*. Пангеномный анализ, показал, что ген *aadK* является частью основного генома *B. subtilis* (Saggese et al., 2022).

Отсутствие доказательств горизонтального переноса гена *aadK* между бактериями подчеркивает его потенциальную безопасность в контексте распространения генов устойчивости к антибиотикам. Таким образом, наличие гена *aadK* и других подобных генов устойчивости у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* не способствует увеличению пула генов резистентности в микробиоте, представляющих угрозу для здоровья человека или животных (Agersø et al., 2019).

Были проанализированы более 100 штаммов *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* различного происхождения, полученных в разные периоды времени с целью изучить эволюцию четырех генов устойчивости – *ermD* (устойчивость к эритромицину), *aadK* и *aph* (устойчивость к стрептомицину), *cat* (устойчивость к хлорамфениколу), а также оценить потенциал горизонтального переноса этих генов (Agersø et al., 2019). Проанализирован состав последовательностей предполагаемых генов устойчивости и оценены их фланкирующие области на наличие мобильных генетических элементов, проведен филогенетический анализ на уровне всего генома, а также на уровне отдельных генов, чтобы найти доказательства латерального переноса этих предполагаемых генов устойчивости к антибиотикам у исследуемых штаммов. Был сделан вывод, что гены *cat*, *aph*, *aadK* и *ermD* у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis*, скорее всего, являются внутренними генами, частью древнего резистома, и нет доказательств, подтверждающих возможность горизонтального переноса этих генов в клетки других бактерий (Agersø et al., 2019).

Ген *fosB*. В настоящее время существует три различных класса ферментов, обеспечивающих устойчивость к фосфомицину. Ферменты класса FosA представляют собой Mn^{2+} и K^{+} -зависимые глутатион-S-трансферазы, которые катализируют нуклеофильное присоединение глутатиона (GSH) к C1 фосфомицина, открывая эпоксидное кольцо антибиотика и приводя к образованию модифицированного соединения, не обладающего бактерицидными свойствами. Гены, кодирующие FosA, были идентифицированы у нескольких видов грамотрицательных бактерий, включая условно-патогенный для человека патоген *P. aeruginosa*. Ферменты класса FosX представляют собой Mn^{2+} -зависимые гидролазы, которые катализируют гидратацию фосфомицина, инактивируя антибиотик. Ферменты класса FosB были обнаружены у грамположительных организмов, таких как *S. aureus* и *B. subtilis*, у которых катализируют Mn^{2+} -зависимое присоединение L-цистеина (L-Cys) или бациллитиола к C1 фосфомицина (Thompson et al., 2013).

Важную роль в механизме устойчивости к фосфомицину у бактерий играет ген *fosB*, кодирующий фосфомицин-тиольную трансферазу. Этот фермент использует либо бациллитиол, либо L-цистеин для разрушения эпоксидного кольца фосфомицина, что приводит к резистентности бактерий к данному антибиотику. В отличие от FosA, активность FosB зависит от кофактора магния (II) (Thompson et al., 2013). Установлено, что ген *fosB*, кроме бацилл, широко распространён среди стафилококков и энтерококков, что подчеркивает его значимость в передаче устойчивости к фосфомицину среди различных видов бактерий. Механизмы устойчивости к фосфомицину важны для эпидемиологических исследований, учитывая, что фосфомицин показывает высокую антимикробную активность против широкого спектра патогенных бактерий (Xin et al., 2022).

Ген *fosB* был идентифицирован у *S. aureus*, *B. subtilis* и у некоторых представителей других родов, что указывает на широкое распространение этого гена среди бактерий микробиоты человека. Обнаружено, что гомологи FosB могут быть классифицированы в три кластера с различиями в последовательностях, структуре и функциях. Помимо этого, было установлено, что FosB присутствует главным образом у *Bacillus* и *Staphylococcus*. Это свидетельствует о том, что бактерии микробиоты человека могут быть чувствительны к фосфомицину, однако вопрос горизонтального переноса гена *fosB* от видов *Bacillus* и *Staphylococcus* к другим бактериям остаётся открытым и критически важным в контексте устойчивости к фосфомицину (Song et al., 2019).

Эти данные подчёркивают важность гена *fosB* в устойчивости к фосфомицину среди бактерий и необходимость разработки стратегий для контроля распространения резистентности, особенно в свете растущего применения фосфомицина в медицине.

Ген *APH(3')-IIa*. Аминогликозиды являются группой антибиотиков, широко используемых в клинической практике. Однако их применение сопряжено с такими проблемами, как токсичность и устойчивость микроорганизмов. Ферменты аминогликозид-фосфотрансферазы (*APH*) модифицируют аминогликозиды путем фосфорилирования их гидроксильных групп в присутствии АТФ в качестве кофактора (Who, 2012). Фермент *APH(3')-IIa* инактивирует важные аминогликозидные антибиотики неомидин и канамицин путем фосфорилирования их гидроксильных групп, а также паромомидин, бутирозин, гентамицин В и рибостамицин (Who, 2012). Показано, что наличие гена *APH(3')-IIa* расширяет спектр инактивации аминогликозидных антибиотиков до амикацина – важного агента для лечения тяжелых системных инфекций, вызванных Гр- бактериями, и важнейшего антибиотика второй линии для борьбы с возбудителем туберкулеза, обладающим МЛУ. Установлено также, что амикацин, важнейший антибиотик второго ряда, используемый исключительно у людей, в некоторой степени фосфорилируется только в условиях *in vitro* (Perlin, Lerner, 1986). Носители варианта последовательности гена *APH(3')-IIa* включают следующие таксономические группы бактерий: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Bacteroidia, Betaproteobacteria, Clostridia, Flavobacteria и Gammaproteobacteria (Woegerbauer et al., 2015).

Ген *APH(3')-IIa* широко используется в качестве селективируемого маркера в биотехнологии и попадает в окружающую среду с лабораторными отходами, содержащими трансгенные организмы. Это может привести к случаям рекомбинации с участием компетентных бактерий окружающей среды. Известно, что внутригенная рекомбинация, приводящая к образованию мозаичных генов, изменяет профили устойчивости определенных генов и видов бактерий. В нескольких исследованиях изучалось, в какой степени гены устойчивости к аминогликозидам подвергаются внутригенной рекомбинации с образованием мозаичных генов. Однако, в настоящее время нет экспериментальных данных, подтверждающих или опровергающих гипотезу о том, что гены-маркеры антибиотиков, такие как ген *APH(3')-IIa* могут участвовать в формировании генов мозаичной устойчивости (Woegerbauer et al., 2015). Обнаружен только один случай рекомбинации с участием *APH(3')-IIa* и формированием мозаичного гена, расположенного на плазмиде в мультирезистентном изоляте *P. aeruginosa* PA96. Исследования показали, что событие рекомбинации произошло в ходе эволюции гомолога *APH(3')-IIa*, присутствующего на плазмиде экологического происхождения в патогенном мультирезистентном штамме *P. aeruginosa*. Наблюдаемое количество вариантов последовательностей *APH(3')-IIa* у *P. aeruginosa* невелико, а их разнообразие, по-видимому, не обусловлено внутригенными рекомбинациями (Woegerbauer et al., 2015).

Гены *BcI*, *BcII*. Ген *BcI* кодирует сериновую β -лактамазу I *B. cereus* класса A группы 2A по классификации Bush и Jacoby (Bush, Jacoby, 2010; Torkar, Bedenić, 2018), гидролизующую ряд пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов у *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis* (Alcock et al., 2023). Роль β -лактамазы I в гидролизе пенициллинов и цефалоспоринов была впервые изучена у *B. cereus* 569/H/9 (Davies, Abraham, 1974). Ген *BcII* *B. cereus* кодирует β -лактамазу II, которая представляет собой термостабильный маннан-связывающий лектин (Torkar, Bedenić, 2018), расщепляющий большое количество пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов у *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* (Alcock et al., 2023). Впервые β -лактамаза II изучена у *B. cereus* 5/B/6. Она представляет собой металло- β -лактамазу цинка (Lim et al., 1988).

4.3. Гены, кодирующие защиту мишени действия антибиотиков

Ген *vmlR*. Антибиотики – это небольшие молекулы, которые специально ингибируют важнейшие клеточные процессы, например, такие как синтез белка. На рибосому воздействуют многочисленные классы антибиотиков, включая плевомутилины, линкозамиды, стрептограминны, фениколы и макролиды, и, наоборот, бактерии используют множество механизмов резистентности, предназначенных для защиты рибосомы от антибиотиков. Две важные стратегии устойчивости к антибиотикам, используемые бактериями, включают отток антибиотиков и защиту рибосом, причем обе стратегии могут быть опосредованы членами большого семейства белков АТФ-связывающей кассеты (ABC). Белки ABC, участвующие в оттоке лекарств, включают мембрансвязанные транспортеры, которые используют энергию для выкачивания антибиотика из клетки. Напротив, белки ABC подкласса F (ABC_F) не содержат трансмембранных доменов для прикрепления их к мембране, а вместо этого придают устойчивость к антибиотику путем связывания с рибосомой и вытеснения препарата из места его связывания на ней. Все белки ABC_F придают устойчивость к антибиотикам, которые связываются с большой субъединицей рибосомы либо в пептидилтрансферазном центре, либо рядом с этим центром в выходном туннеле рибосомы. Белки ABC_F можно разделить на отдельные классы на основе их профилей устойчивости (Crowe-McAuliffe et al., 2018). Устойчивость к антибиотикам, опосредованная белками ABC_F, может сочетаться с другими механизмами, особенно с устойчивостью, опосредованной метилированием 23S рРНК.

Многие Gr⁺ патогенные бактерии используют рибосомальные защитные белки (ribosomal protective proteins, RPP) для придания устойчивости к клинически важным антибиотикам. У *B. subtilis* рибосомальный защитный белок VmlR придает устойчивость к линкомицину и стрептограмину А. VmlR представляет собой белок АТФ-связывающей

кассеты (ABC) типа F (Crowe-McAuliffe et al., 2018) и принадлежит к семейству факторов устойчивости к антибиотикам ABCF, которые связываются с большой субъединицей рибосомы, вытесняя антибиотики, воздействующие на пептидилтрансферазный центр (Obana et al., 2023). Таким образом, у бактерий процесс транскрипции в присутствии эритромицина, олеандомицина, линкомицина и стрептограмина А индуцирует экспрессию гена *vmlR* и образование защитного белка VmlR. При нарушении гена *vmlR* и, следовательно, в отсутствии синтеза защитного белка VmlR, чувствительность к макролидам эритромицину и олеандомицину у *B. subtilis* увеличивается в 2 раза (Takada et al., 2022).

Белки устойчивости к антибиотикам семейства ABCF широко распространены у Гр⁺ бактерий, но также обнаруживаются у некоторых Г⁻ бактерий. Белки ABCF могут кодироваться хромосомами и/или плазмидами и обнаруживаются во многих клинически значимых патогенных бактериях, включая *S. aureus*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes* и *E. coli* (Takada et al., 2022). Белки ABCF, кодируемые горизонтально переносимой плазмидой, представлены стафилококковыми белками Vga и PoxA, а также энтерококковыми OprA. Быстрое горизонтальное распространение этих факторов резистентности среди бактерий вызывает тревогу, особенно в случае с белками PoxA и OprA, которые вызывают устойчивость к оксазолидиноновым антибиотикам последнего поколения, таким как линезолид. Некоторые из защитных белков ABCF кодируются хромосомами, а наиболее изученные представители обнаружены у *B. subtilis* (белок VmlR), *E. faecalis* (белок LsaA), *Listeria monocytogenes* (белок VgaL). Эти белки ответственны за внутреннюю (хромосомную) устойчивость этих видов бактерий к антибиотикам (Takada et al., 2022).

4.4. Гены, кодирующие модификацию мишени действия антибиотика

Ген *clbA*. Этот ген играет важную роль в механизме резистентности бактерий к антибиотикам, особенно у *Bacillus velezensis* MEP218, который выявлен как источник биоактивных молекул с антимикробной активностью. Ген *clbA* ассоциирован с синтезом и регуляцией антибиотических соединений, что делает его ключевым элементом в понимании устойчивости бактерий к различным антибиотикам (Liu et al., 2021). Ген *clbA* относится к группе генов, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, которые бактерии используют для защиты от антимикробных агентов и конкуренции в окружающей среде.

Функция гена *clbA* связана с синтезом компонентов, участвующих в формировании клеточной стенки бактерий, а также с производством определенных типов антибиотиков, которые могут быть использованы бактериями для подавления роста конкурирующих микроорганизмов. Участие *clbA* в формировании антибиотикорезистентности, обеспечивает бактериям механизмы для борьбы с антибиотиками, такими как оксазолидиноны, фениколы, линкозамиды, стрептограмины А и плеуромутилины, путем модификации мише-

ней антибиотиков или активного выведения антибиотиков из клетки (Liu et al., 2021). Механизм действия *clbA* в контексте резистентности может включать изменение структуры или заряда молекул-мишеней антибиотиков в клеточной стенке, что уменьшает способность антибиотика связываться с мишенью и оказывать свое действие. Кроме того, *clbA* может участвовать в механизмах эффлюкса, активно удаляя антибиотические молекулы из клетки и, таким образом, снижая их концентрацию в цитоплазме до уровня, не достаточного для оказания терапевтического эффекта (Alcock et al., 2023).

Влияние гена *clbA* на устойчивость к разным веществам делает его значимым маркером в изучении бактериальной резистентности и предоставляет потенциальную мишень для разработки новых антибиотиков или методов подавления устойчивости бактерий. Исследования, направленные на понимание роли *clbA* и связанных с ним путей в резистентности, могут способствовать разработке новых стратегий борьбы с бактериальной резистентностью (Medeot et al., 2023).

Ген *bcrC*. Клеточная оболочка *B. subtilis* служит важной защитой от внешней среды и стрессовых факторов, таких как антибиотики, благодаря составу плазматической мембраны и пептидогликановой клеточной стенки. Эта стенка определяет форму бактерии и защищает её от разрыва. Важную роль в синтезе клеточной стенки играет мембранный цикл липида II, обеспечивающий строительные блоки, которые собираются в цитоплазме и транспортируются наружу. Ундекапренилфосфат (UP), молекула-носитель в этом процессе, перерабатывается путём дефосфорилирования из ундекапренилпирофосфата (UPP) под действием фосфатаз, включая ферменты *BcrC* и *UppP* (Willdigg et al., 2024). Ген *bcrC* *B. subtilis* кодирует фосфатазу, которая является ключевым элементом в ответе на стресс клеточной оболочки, вызванный антибиотиками. Экспрессия гена *bcrC* увеличивается в условиях стресса, способствуя устойчивости к антибиотикам, например, к бацитрацину – полипептидному антибиотику, который подавляет синтез пептидогликана клеточной стенки у грамположительных бактерий. Фосфатаза *BcrC* оказывается более важной для защиты от стресса клеточной оболочки во время роста, чем *UppP*, особенно когда уровни фосфатазы *UPP* ограничены (Willdigg et al., 2024).

Ген *bcrC*, взаимодействуя с другими генами, такими как *bceAB*, способствует устойчивости к бацитрацину – антибиотику, который связывается с ундекапренилпирофосфатом, блокируя синтез пептидогликана. Эти взаимодействия подтверждают модель, согласно которой индукция оперона *utpAB* помогает клеткам противостоять стрессу, вызванному бацитрацином, либо способствуя переносу носителя липида UP, либо влияя на сборку или функцию комплексов, связанных с мембраной и участвующих в гомеостазе клеточной стенки. Таким образом, ген *bcrC* у *B. subtilis* играет критически важную роль в

механизмах устойчивости к антибиотикам, особенно к бацитрацину, участвуя в цикле регуляции и переработки липидов. Это необходимо для поддержания функциональности клеточной стенки и обеспечения защиты от антибиотиков, нацеленных на клеточную стенку, что подчеркивает важность *bcrC* в защите *B. subtilis* от антибиотиков и предоставляет новые цели для разработки антимикробных стратегий (Willdigg et al., 2024).

Ген *ermD*. У многих видов бацилл, как уже упоминалось выше, обнаружен ген *ermD* (эритромицин резистентная метилаза), ответственный за устойчивость к макролиду эритромицину и линкозамиду клиндамицину. Механизмом устойчивости к этим антибиотикам является посттранскрипционная модификация 23S рНК путем моно/диметилирования остатка аденина. В результате нарушается комплиментарность антибиотика к рибосоме и препарат не может ингибировать синтез белка. Все метилазы рНК метилируют один и тот же остаток аденина, что приводит к фенотипу устойчивости к макролидам-линкозидам-стрептограмину В (MLSB), при этом показано, что гены *erm* обеспечивают перекрестную резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* и преобладают у бактерий с высокой мультирезистентностью (Anjum et al., 2016; Jeong et al., 2020; Alcock et al., 2023). Полногеномное секвенирование и фенотипическое тестирование 104 штаммов *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* из различных источников показало, что у всех 30 штаммов *B. paralicheniformis*, и у 20 из 74 штаммов *B. licheniformis* обнаружен хромосомный ген *ermD*, кодирующий рНК-аденин-N6-диметилазу, состоящую из 286-287 аминокислот (Agersø et al., 2019). Следовательно, устойчивость к эритромицину у бацилл очень хорошо коррелирует с наличием гена *ermD*. Показано, что классы генов *ermD* и *ermC* локализованы на хромосоме у *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и близкородственных видов *Bacillus*, резистентных к эритромицину и клиндамицину, при этом они не связаны с какими-либо мобильными генетическими элементами (Agersø et al., 2019; Jeong et al., 2020).

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 5. Объекты и методы исследований

5.1. Объекты исследований

В качестве объектов исследований использовали 28 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больничной лаборатории и идентифицированных до вида путем исследования их морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков, с помощью анализа генов 16S рНК, методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования. В опытах по определению устойчивости к антибиотикам использовали также виды бацилл, выделенные ранее с поверхности обо-

рудования РС МКС и идентифицированные с помощью молекулярных методов. Эти штаммы – *B. pumilus* 8-12 (ВКПМ: В-12640), *B. subtilis* 14-12 (ВКПМ: В-12636), *B. licheniformis* 7-12 (ВКПМ: В-12638), содержатся в коллекции культур ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». Для сравнительного изучения были использованы также штаммы *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. pumilus* КМ-МГУ 364, *B. subtilis* КМ-МГУ 25 из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

5.2. Выделение первичных изолятов бактерий с РС МКС

Пробы с поверхностей различных приборов РС МКС в зонах возможного скопления микроорганизмов отбирались с помощью ватных тампонов на площади 100 см² космонавтами на орбите Земли в ячейки специальной укладки (Рисунок 9), а затем в этой укладке доставлялись на Землю для микробиологического анализа. Для получения первичных изолятов бактерий осуществляли высевы образцов материалов, отобранных на РС МКС, на поверхность таких плотных питательных сред, как мясо-пептонный агар (МПА) с 1% глюкозы и 0,5 % дрожжевого экстракта, с рН=7,2 и БСА с рН 6,9. Образцы материалов, полученные с РС МКС в специальной укладке в форме ватных палочек со смывом микроорганизмов с площадей оборудования РС МКС в 100 см², вымачивали в пробирках с 3 мл стерильного физраствора в течение 4 часов с использованием установки Вортекс V-1. Затем 10-100 мкл полученной суспензии наносили на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашке Петри и распределяли стерильным шпателем Дригальского. Культивирование осуществляли при температуре 30°С в течение 24–216 ч. Рост культур на чашках анализировали через 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 240 часов.

5.3. Выделение первичных изолятов бактерий из больничной лаборатории

Пробы с поверхностей оборудования лаборатории для отбора проб крови отбирали с помощью ватных тампонов на площади 100 см² в стерильные пробирки. Пробы отбирали до начала работы лаборатории, через 10 мин после ночного УФ-облучения и утренней антисептической обработки рабочих поверхностей с помощью дезрастворов. Для получения первичных изолятов бактерий высевали образцов материалов, отобранных в лаборатории, на поверхность мясо-пептонного агара (МПА) с 1% глюкозы и 0,5 % дрожжевого экстракта с рН=7,2 и БСА с рН 6,9. Образцы материалов в форме ватных палочек со смывом микроорганизмов вымачивали в пробирках с 3 мл стерильного физраствора в течение 4 часов с использованием установки Вортекс V-1. Затем 10-100 мкл полученной суспензии наносили на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашке Петри и распределяли стерильным шпателем. Культивирование осуществляли при температуре 30° С

в течение 24-240 ч. Рост культур на чашках анализировали через 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 240 часов.

5.4. Получение чистых культур бактерий с РС МКС и больничной лаборатории

С целью получения чистых культур бактерий выбирали те чашки Петри с посевами, где можно было оценить различные морфотипы колоний. Для этого использовали чашки, где количество колоний было небольшим (до 100 колоний), что позволяло получить крупные колонии и изучить различные морфотипы колоний в динамике через 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 240 часов. Получение чистых культур бактерий осуществляли из отдельных колоний определенных морфотипов, сформировавшихся на поверхности плотных питательных сред через 96-168 часов. Из изолятов культур бактерий различных морфотипов, полученных на чашках, методом повторных рассевов на МПА+1% глюкозы+0,5% дрожжевого экстракта и бульон сусло-агар (БСА) получали чистые культуры бактерий.

5.5. Определение чистоты культур бактерий

Чистоту культур бактерий анализировали методом микроскопии с использованием препаратов «раздавленная капля», фазовых объективов 40х и 100х, препаратов фиксированных окрашенных фуксином клеток и фазового объектива 100х с масляной иммерсией. Использовали также троекратный метод посева суспензий клеток в стерильной водопроводной воде на плотные питательные среды – МПА + 1% глюкозы + 0,5% дрожжевого экстракта с рН=7,2 и БСА с рН=7,0 для получения отдельных колоний только одного, характерного для данных питательных сред морфотипа бактерий.

5.6. Окраска клеток по Граму

Окраска по Граму осуществляли с использованием 24-часовых культур бактерий, выросших на МПА + 1% глюкозы + 0,5% дрожжевого экстракта с рН=7,2 или БСА с рН=7,0 с использованием общепринятой методики (Герхард, 1983).

5.7. Определение подвижности клеток

Определение подвижности клеток осуществляли у 8-48 часовых культур бактерий при росте на МПА + 1% глюкозы + 0,5% дрожжевого экстракта с использованием препаратов «раздавленная капля» и фазовых объективов 40х и 100х.

5.8. Определение морфологии клеток

Морфологию клеток бактерий изучали, культивируя их на среде МПА+1% глюкозы+0,5% дрожжевого экстракта или БСА – то есть средах, на которых они были выделены из проб укладки РС МКС или из проб больничной лаборатории. Исследовали клетки разного возраста – от 8 часов (для определения морфологии подвижных клеток) до 240 часов (для определения морфологии старых клеток, а также определения наличия и свойств эндоспор). Морфологию клеток бактерий анализировали методом микроскопии с использо-

ванием препаратов «раздавленная капля» и фазового объектива 40x и фиксированных окрашенных фуксином клеток и фазового объектива 100x с масляной иммерсией.

5.9. Определение размеров клеток

Размеры клеток определяли с помощью объект-микрометра с использованием 24-96 часовых культур бактерий, препаратов «раздавленная капля», фазового объектива 100x и масляной иммерсии. Использовали также фиксированные окрашенные фуксином клетки и фазовый объектив 100x с масляной иммерсией.

5.10. Определение наличия эндоспор в клетках

Для подтверждения способности образовывать эндоспоры видами бактерий, предположительно образующих эндоспоры, чистые культуры бактерий высевали на картофельную среду. Для ее приготовления 200 г очищенного картофеля заливали 200 мл водопроводной воды и кипятили 30 минут. Затем объем картофельного отвара доводили до 400 мл, фильтровали через марлю и добавляли 2% агара. Среду стерилизовали при 1 атм. Время культивирования бактерий на этой среде 72-120 часов. Наличие эндоспор определяли методом микроскопии с использованием препаратов «раздавленная капля» и фазовых объективов 40x и 100x, а также фиксированных окрашенных фуксином клеток и объектива 100x с масляной иммерсией. Для определения способности формировать культурой бактерий эндоспоры применялся также тест по 10-минутному кипячению клеток. Для этого готовили суспензию бактерий, культивировавшихся на картофельной среде в течение 72 часов, в стерильном физрастворе и прогревали эту суспензию 10 минут при 100⁰С в пробирке на водяной бане с последующим высевом прогретой суспензии на среду МПА+1% глюкозы+0,5% дрожжевого экстракта.

5.11. Определение морфологии эндоспор в клетках

Использовали препараты «раздавленная капля», фазово-контрастный объектив 100x, масляную иммерсию. В некоторых случаях применяли дифференциальную окраску споры и цитоплазмы. Для этого на предметном стекле готовили мазок бактерий, высушивали его, фиксировали над пламенем горелки и заливали раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель на препарате доводили до кипения в течение 10-20 сек с добавлением дополнительных порций красителя по мере его испарения. Препарат охлаждали, промывали водой и дополнительно в течение 30 сек докрашивали 0,5%-ным водным раствором сафранина. Краситель сливали, препарат промывали водой и просматривали с масляной иммерсией. Споры окрашивались в синий цвет, а клетки в красный. Морфологию (форму) эндоспор – округлая, овальная, палочковидная определяли с использованием 48-240 часовых культур бактерий, выращенных на картофельной среде. Отмечали различные типы

расположения эндоспор в клетках – центральная, терминальная (концевая), латеральная (боковая), а также изменение формы (ширины) клетки сформированной эндоспорой.

5.12. Определение наличия в клетках параспоральных телец

Для обнаружения параспоральных телец использовали 48-240 часовые культуры бактерий, выращенных на картофельной среде, препараты «раздавленная капля», фазово-контрастный объектив 100х, масляную иммерсию. Для обнаружения параспоральных телец применяли специальную окраску. Для этого готовили тонкий мазок клеток, высушивали его на воздухе, фиксировали над пламенем горелки и в течение 2 мин окрашивали анилиновым черным. Затем осторожно смывали краску водой и мазок в течение 15 с докрашивали фуксином Циля. Затем препарат промывали водой, высушивали и микроскопировали с иммерсионной системой. При такой окраске параспоральные тельца окрашиваются в черный, а клетки – в розовый цвет.

5.13. Определение отношения бактерий к кислороду

Отношения бактерий к кислороду определяли на среде состава (г): дрожжевой экстракт – 0,5; глюкоза – 0,5; агар – 0,1; МПБ – 100 мл; рН среды – 7,0. Среду расплавляли, разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали при 0,5 ати. Отдельно в пробирках стерилизовали парафин при 1 ати. Перед посевом пробирки со средой и парафином, а также пробирку с 5 мл нестерильной воды и термометром ставили в кипящую водяную баню на 20 мин. Затем пробирку со средой и водой переносили в баню с холодной водой, и как только температура в пробирке с водой и термометром снижалась до 40⁰С, засекали стерильную среду в пробирках, погружая в нее петлю культуры. После посева поверхность среды заливали 3 мл парафина. Засекали также непрогретую среду и парафином ее не заливали. Все пробирки помещали в термостат при 30⁰С на 5 суток. Аэробные бактерии вырастали только на поверхности среды, не залитой парафином, анаэробные бактерии – только на прогретой среде, залитой парафином, а факультативные анаэробы росли в 2 пробирка.

5.14. Тест на каталазу

Для обнаружения каталазы снимали часть выросшей культуры в поверхности агаризованной среды неметаллическим инструментом и смешивали на предметном стекле с каплей 3%-ной перекиси водорода. О наличии каталазы судили по образованию пузырьков газа, наблюдаемых через 1-2 мин невооруженным глазом или в микроскоп при малом увеличении.

5.15. Образование бактериями кислоты из глюкозы

Способность бактерий образовывать кислоту из глюкозы определяли на среде состава (г): (NH₄)₂HPO₄ – 0,1; дрожжевой экстракт – 0,02; MgSO₄– 0,02; KCl– 0,02; 0,04%-ный

водный раствор бромкрезолового пурпурного –1,5 мл; вода дистиллированная – 100 мл. Значение pH среды 6,8. Эту среду разливали по 10 мл в пробирки и стерилизовали при 1 ати. Отдельно готовили 10 %-ный раствор глюкозы в дистиллированной воде и стерилизуют его при 0,5 ати. Перед засевом бактерий в пробирки стерильную глюкозу добавляли к среде до концентрации 1%. Бактерии культивировали в течение 6 суток в термостате при 30°C. Образование кислоты отмечали по изменению цвета индикатора от пурпурного при pH среды 6,8 до желтого при pH 5,2.

5.16. Идентификация культур бактерий анализом 16S рРНК

Для идентификации культур бактерий анализом 16S рРНК проводили выделение ДНК из клеток соответствующих штаммов. Бактерии выращивали в жидкой среде МПБ с 1 % глюкозы и 0,5% дрожжевого экстракта (pH=7,2). ДНК выделяли с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit KO 512 (Thermo Scientific, США). Для выделения ДНК использовалась методика, рекомендуемая разработчиками комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit KO 512. Очищенную ДНК использовали в качестве матрицы для последующей амплификации.

ПЦР осуществляли в соответствии с протоколом, рекомендованным для каждого фермента. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров («Синтол», Россия) B63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3) и B1387r (5-GGGCGGWGT GTA CAA GGC-3'). Состав реакционной смеси (25 мкл): 10 нг геномной ДНК, буфер для ПЦР, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 μM каждого праймера, 0,25 mM dNTP и 0,06 μl Taq-полимеразы («Синтол, Россия). Температурный режим: один цикл 3 мин при 94°C; 30 циклов по 20 с при 90°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. Окончательное удлинение в течение 4 мин при 72°C.

Полученные с помощью ПЦР фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле с помощью электрофореза (120 В). Агарозный гель готовили, добавляя агарозу (1-1,2%) в 1 х трис-ацетатный (ТАЕ) буфер, нагревали до 90-95°C, перемешивали до полного растворения агарозы, добавляли 7,5 мкл раствора бромистого этидия на каждые 150 мл раствора, охлаждали до 45-50°C и заливали в специальную форму. После полимеризации гель переносили в электрофорезную горизонтальную камеру Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США). В образцы с фрагментами ДНК добавляли буфер в объемном соотношении 1:5. Электрофоретическое разделение проводили в буфере 1x ТАЕ. Фрагменты нуклеиновых кислот определяли в УФ-свете.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® Big Dye™ Terminator v.3.1 (Thermo Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo

Scientific, США). Для видовой идентификации проводили сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с базой данных GenBank.

5.17. Идентификация культур бактерий методом MALDI-TOF MS

Одной из самых перспективных технологий идентификации микроорганизмов является MALDI-TOF MS — матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (от англ. «matrix-assisted laser desorption ionization massspectrometry»). Широкое применение этого метода в практике клинической микробиологии в последние годы объясняется высокой эффективностью, быстротой и экономичностью метода. Используется чистая культура бактерий или дрожжей в виде колонии на питательной среде или экстракты (Hrabak et al., 2013; Баранцевич, Баранцевич, 2014). MALDI-TOF MS является методом, позволяющим ионизировать под воздействием лазера биологические макромолекулы (пептиды, белки, ДНК, олигонуклеотиды, липополисахариды и др.) в присутствии особого вещества – матрицы. Метод позволяет анализировать спектральные характеристики значительного числа белковых молекул, преимущественного рибосомальных белков, являющихся идентификационным набором для конкретного микроорганизма. За счет разной скорости перемещения, обратно пропорциональной массе иона, полученные ионы разделяются во времяпролетном анализаторе. На основании информации о пути и времени перемещения иона от источника ионизации до детектора вычисляется скорость движения иона и отношение массы к заряду (m/z) для каждого иона. Процесс идентификации с помощью MALDI-TOF MS основан на сравнении полученных масс-спектров с референсными спектрами, присутствующими в базах данных, поставляемых производителями вместе с оборудованием. При достаточном количестве совпадений можно сделать вывод о принадлежности исследуемого микроорганизма к конкретной таксономической группе. Метод позволяет получить спектр, специфичный для рода, вида или даже штамма. Очень важно то, что результаты идентификации микроорганизмов с применением MALDI-TOF MS не требуют дополнительного подтверждения классическими биохимическими тестами.

Идентификация микроорганизмов была осуществлена на приборе MALDI-TOF autoflex III L200 Biotyper (Bruker, Германия). Для анализа с помощью MALDI-TOF MS использовались чистые культуры, пересейанные не менее 4-5 раз. Для идентификации брали одну изолированную колонию микроорганизма, как материал, содержащий микробные белки, и с помощью одноразовой микробиологической петли наносили на лунку специальной мишени, соответствующей используемому типу MALDI-TOF масс-спектрометра. Биомассу равномерно распределяли по поверхности лунки, не выходя за ее края. Для каждого исследуемого образца использовали 3 лунки для получения наиболее достоверного

результата. Далее обрабатывали материал, нанесенный на лунку раствором матрицы – вещества, обеспечивающего включение микробных протеинов в его структуру при высыхании для дальнейшего лазер-индуцированного получения из этих протеинов ионизированных пептидов. Для этого сразу после высыхания нанесенной на мишень биомассы сверху наносили 1-2 мкл матрицы – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе ацетонитрила и трифторуксусной (ТФУ) кислоты (вода - 19 частей, ацетонитрил - 20 частей, ТФУ-кислота - 1 часть), после чего материал высушивали на воздухе при комнатной температуре, либо в потоке чистого воздуха или азота. Затем устанавливали мишень с обработанной матрицей микробным материалом в соответствующее устройство MALDI-TOF масс-спектрометра. С помощью программного обеспечения MALDI-TOF масс-спектрометра проводили автоматическую идентификацию на основании сравнения собранных исходных спектров с референсными спектрами базы данных.

5.18. Полногеномное секвенирование бактерий

Полногеномное секвенирование осуществляли с целью идентификации штаммов и для определения генов устойчивости к антибиотикам. Для полногеномного секвенирования выделяли ДНК из клеток штаммов, выращенных в жидкой среде с мясо-пептонным бульоном и 1% глюкозы, проводили с помощью набора реактивов Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals, США) по протоколу производителя. Геномную ДНК секвенировали с использованием платформ Illumina MiSeq (Illumina Inc., США). Библиотеки Illumina были подготовлены с использованием набора библиотек Кара Hyperplus (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные последовательности были идентифицированы с использованием программы сверхбыстрой классификации метагеномных последовательностей Kraken (Wood, Salzberg, 2014). Установление наличия в геноме штаммов бактерий рода *Bacillus* генов устойчивости к антибиотикам осуществляли с помощью базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD (Alcock et al., 2023).

5.19. Оценка чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом

Основной целью определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций у конкретных пациентов. Определение чувствительности также проводят с целью эпидемиологического наблюдения за распространением резистентности среди микроорганизмов и в процессе изучения новых препаратов. Использование унифицированных методов определения чувствительности и подходов к интерпретации результатов является необходимым условием для формирования единой системы обработки, анализа, составления отчетов и обмена

данными для повышения эффективности системы эпидемиологического наблюдения за антибиотикорезистентностью. В настоящее время теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST).

Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом применяли агар Мюллера-Хинтона состава г/л: мясной экстракт сухой – 3,0; гидролизат казеина сухой – 17,5; крахмал растворимый – 0,5; агар – 18,0; вода дистиллированная – до 1 л, значение рН = 7,0. Среду разливали по чашкам Петри на ровной поверхности таким образом, чтобы толщина слоя агара составляла 5 мм. На круглую чашку Петри диаметром 90 мм требовалось около 25 мл агара. Для приготовления инокулюма бактерий материал изолированных колоний петлей вносили в 5 мл стерильного физиологического раствора, смешивали до получения однородной суспензии плотности 0,5 по стандарту мутности Мак-Фарланда, что соответствует содержанию 5×10^5 клеток в 1 мл и обеспечивает формирование полусливного роста бактерий на поверхности агаризованной среды. Суспензия бактерий использовали в течение 30-40 минут после приготовления. Суспензию бактерий в количестве 200 мкл наносили на поверхность среды и распределяли с помощью стеклянного шпателя Дригальского. Оставляли чашки на 10 минут для абсорбции посевного материала. Диски с антибиотиками наносили на поверхность среды в чашках через 15 минут после инокуляции чашек с агаром Мюллера-Хинтона суспензией бактерий. Через 15 минут после нанесения дисков чашки с дисками помещали в термостат и инкубировали при 35°C в течение 18-20 ч. В результате экспериментов определяли специфические значения диаметров зон подавления роста бактерий, используемые для оценки штаммов в соответствии с клиническими категориями «чувствительный» или «резистентный» по таблицам критериев интерпретации результатов, представленными (EUCAST, версия 12.0. 2022, www.eucast.org, 2022). Чувствительный (Ч) – уровень активности препарата свидетельствует о высокой вероятности клинической эффективности при использовании препарата в стандартной терапевтической дозе для лечения инфекции, вызванной данным микроорганизмом. Резистентный (Р) – уровень активности препарата свидетельствует о высокой вероятности клинической неэффективности даже при использовании высоких доз.

5.20. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом разведений в жидкой питательной среде

Референтным методом определения чувствительности бактерий к антибиотикам является метод разведений в жидких питательных средах (Durand et al., 2021;

www.eucast.org. 2022). Определение значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков проводили методом их последовательных двукратных разведений с использованием 96-луночных планшетов (Eppendorf, Германия). Для этого выращивали культуру бактерий в среде МПБ с 1% глюкозы и определяли значение оптической плотности суспензии (OD 600 нм), после чего культуру клеток разбавляли средой МПБ с 1% глюкозы до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и такую суспензию вносили в лунки планшета. Затем в лунки вносили антибиотик с таким расчетом, чтобы его концентрация в лунке первого ряда 12-рядного планшета составляла 4096 мкг/мл с последующим двукратным разведением в лунках следующих 11 рядов до концентрации 2 мкг/мл. Планшеты с посевами помещали в термостат и инкубировали при 35°C в течение 20 ч. Рост бактерий оценивали через 20 часов, добавляя в лунки резазурин (Sigma) до концентрации 50 мкМ. Синий краситель резазурин при росте клеток восстанавливается с образованием розового флуоресцирующего резорурфина.

5.21. Определение активности эффлюкс-систем

Для оценки активности эффлюкс-систем использовали в 96-луночные планшеты (Eppendorf, Германия). Получали суточную культуру клеток бактерий в среде МПБ с 1% глюкозы, измеряли оптическую плотность суспензии (OD 600 нм), а затем клетки разбавляли средой МПБ с 1% глюкозы до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и вносили в лунки планшета соответствующий антибиотик в концентрации от 4096 до 2 мкг/мл. Далее в каждую лунку добавляли протонофор – карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон (Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenyl hydrazone, СССР, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. В качестве контролей применяли варианты лунок с антибиотиком, но без добавления СССР, а также лунки, содержащие только питательную среду с клетками бактерий и СССР. Планшеты инкубировали в термостате течение 20 часов при 35°C. О действии антибиотиков и СССР на рост бактерий в лунках планшета судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ (Elshikh et al., 2016). Синий краситель резазурин при росте клеток восстанавливается в розовый флуоресцирующий резорурфин, а в ячейках, где рост бактерий отсутствует, краситель остается синим. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Активности эффлюкса определяли по отношению кратности уменьшения (КУ) МИК антибиотиков в культурах клеток без СССР к значениям МИК при добавлении протонофора. При величине КУ<4 регистрировали отсутствие эффлюкса, при значении КУ в диапазоне от 4 до 16 отмечали его умеренную активность, а при КУ>16 фиксировали высокую активность эффлюкс-систем (Ardebili et al., 2014; Elshikh et al., 2016).

5.22. Определение активности металло-β-лактамаз (МБЛ)

Для оценки активности металло-β-лактамаз (МБЛ) использовали метод дисков с ЭДТА (Aoki et al., 2010; Лазарева и др. 2015). Суспензию клеток распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтон состава (г/л): мясной экстракт сухой – 3,0; гидролизат казеина сухой – 17,5; крахмал растворимый – 0,5; агар – 18,0; вода дистиллированная – до 1 л, значение pH = 7,0. Затем в центр среды помещали диск с 10 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, а на расстоянии 15 мм от него диски с разными антибиотиками. Образование зоны подавления роста бактериального газона между диском с ЭДТА и диском, содержащим конкретный антибиотик, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемой бактерии. ЭДТА выступает хелатором ионов металлов, входящих в активный центр металло-β-лактамаз и нарушает действие этих ферментов, поэтому наличие диска с ЭДТА вызывает локальное снижение устойчивости бактерий к антибиотикам и соответственно приводит к расширению диаметров зон устойчивости к антибиотикам дисковым методом.

5.23. Определение генов клинически значимых лактамаз

Гены клинически значимых лактамаз детектировали методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR, Real-Time PCR) с помощью набора «Гены VIM, NDM, OXA-48, KPC, обуславливающие резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином I, II, III и IV поколений» (Литех, Россия), согласно инструкции производителя. Бактериальную ДНК для этого выделяли с помощью набора ДНК-сорб (Интерлабсервис, Россия).

5.24. УФ-облучение эндоспор штаммов бактерий рода *Bacillus*

Для получения эндоспор культуры бактерий выращивали в жидкой картофельной среде в аэробных условиях в течение 120 часов. Затем суспензии проверяли на наличие вегетативных клеток, центрифугировали и разводили эндоспоры буфером до концентрации не более 1000 эндоспор в 1 мл. Концентрацию спор в процессе разведения подсчитывали с помощью камеры Горяева. Суспензии спор помещали в стерильные чашки Петри в объеме 5 мл и облучали открытую чашку со спорами на установке БУФ-1 при длине волны 240 нм в течение разного времени – от 1 до 30 мин. Доза облучения с каждой минутой экспозиции возрастала на 96 Дж/м². После каждой новой минуты экспозиции отбирали из чашки 50 мкл суспензии облученных эндоспор, наносили на поверхность среды МПА + 0,5% глюкозы и распределяли шпателем по поверхности. Чашки с эндоспорами инкубировали в термостате при 30°C в течение 144 часов.

5.25. Математическая обработка результатов

Все опыты проводили трехкратно в двух повторностях в каждой серии. Результаты в их конечном виде (приведенные в таблицах) получали путем вычисления среднего ариф-

метического (X) из результатов всех повторностей (X_n) при условии, что они различались не более чем на 10% ($|X_n - X| \leq 0,05 X$). При этом расчет среднего арифметического проводили, исключая "сомнительные результаты" ("X"), не входящие в доверительный интервал $|X_n - X| = t \cdot \sigma$, где X – среднее арифметическое без учета "сомнительных результатов", t – нормированное отклонение при $P_{0,95}$ для малых выборок ($n < 30$), а σ – среднее квадратичное отклонение ($\pm \sqrt{(\sum(X_n - X)^2 / (n-1))}$) без учета "X".

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ¹

Глава 6. Бактерии на борту РС МКС и в больничной лаборатории

6.1. Бактериальная обсемененность поверхностей оборудования РС МКС

Одной из первых задач работы являлось выявление доминирующих на поверхностях оборудования РС МКС бактерий. С этой целью мы использовали возможности программы мониторинга состава микробиоты на Российском сегменте Международной космической станции (РС МКС). Мониторинг проводится в рамках «Долгосрочной программы научно-прикладных исследований и экспериментов, планируемых на российском сегменте МКС». Как известно, МКС представляет собой замкнутое пространство, являющееся благоприятной средой для развития различных бактерий и грибов в результате наличия доступных субстратов, постоянной температуры, повышенной влажности и образованием конденсата на поверхности оборудования. На борту РС МКС мониторинг состава микроорганизмов осуществляется с помощью специальной укладки «Биопробы» (Рисунок 9). Для этого пробы отбираются с помощью ватных тампонов с поверхностей различных приборов станции в ячейки специальной укладки, а затем доставляются в этой укладке на Землю для микробиологического анализа.

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

- 1. Еникеев Р.Р., Захарчук Л.М.** Бактерии рода *Bacillus* на Международной космической станции // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2023. Т. 78. № 3. С. 178-185. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-5 (ИФ РИНЦ = 0,764)
- 2. Еникеев Р.Р., Татарина Н.Ю., Захарчук Л.М., Виноградова Е.Н.** Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, полученных из медицинского учреждения // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2022. Т. 77. № 2. С. 89–97. (ИФ РИНЦ = 0,764)
- 3. Еникеев Р.Р., Татарина Н.Ю., Захарчук Л.М.** Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с международной космической станции // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020. Т. 75. № 4. С. 265-272. (ИФ РИНЦ = 0,764)

Места отбора проб на РС МКС в количестве 20 точек определены специалистами ОАО РКК «Энергия» и находятся в различных зонах возможного скопления и развития на борту микроорганизмов – бактерий и грибов. Однако кроме 20 основных проб в точках, определенных заранее специалистами ОАО РКК «Энергия», к каждой серии из 20 проб космонавты берут еще дополнительно 6 проб в местах, определяемых экипажем. Кроме анализа поверхностей оборудования на РС МКС ведется также мониторинг состава микробиоты в воздухе станции. Для этого периодически проводят анализ пыли, которую собирают специальным пылесосом. Исследуют микроорганизмы, которые оседают на воздушных фильтрах пылесоса. Микробиологический мониторинг на РС МКС осуществляется со строгой периодичностью 2 раза в год весной и осенью уже в течение 17 лет и запланирован на весь период эксплуатации станции до 2026 года.

Известно, что на МКС обитают бактерии разных групп – грамположительные и грамотрицательные аэробные и анаэробные кокки, палочки, спириллы, представители физиологических групп, относящиеся к различным семействам, родам и видам (Castro et al., 2004; Novikova et al., 2006; Mora et al., 2016). Но особенно важную роль на поверхностях оборудования МКС и в воздухе могут играть спорообразующие бактерии, которые хорошо выживают в окружающей среде в форме эндоспор, чему способствует низкое содержание влаги и питательных веществ, а также постоянная температура. На элементах оборудования МКС с наибольшей вероятностью могут выживать представители родов, растущих в аэробных условиях, таких как *Bacillus*, *Sulfobacillus*, *Sporosarcina* (Novikova et al., 2006; Timmerly et al., 2011; Mora et al., 2016).

Бактерии рода *Bacillus* вездесущи в природе, встречаются повсеместно, число их видов постоянно растет и уже превышает 260 (Christie, Setlow, 2020; Nikolaidis et al., 2022). Однако на МКС видовое разнообразие изученных там бацилл составляет не более двух десятков (Mora et al., 2016). Следовательно, в условиях МКС остаются жизнеспособными только те виды, которые могут переносить, прежде всего, длительное высушивание и недостаток питательных веществ. Кроме того, могут преобладать и те виды, которые лучше выдерживают предполетную обработку материалов и оборудования с помощью УФ-облучения, жидких и газообразных дезинфектантов.



Рисунок 9. Специальная укладка «Биопробы» для отбора с поверхности и транспортировки на Землю биопроб с борта РС МКС.

6.2. Получение и характеристика первичных изолятов бактерий с РС МКС

Для получения первичных изолятов бактерий образцы материалов, полученные в укладке «Биопробы» (Рисунок 9) в форме ватных палочек со смывом микроорганизмов с поверхности приборов РС МКС площадью в 100 см^2 , вымачивали в пробирках с 3 мл стерильного физраствора в течение 4 часов с использованием установки Вортекс V-1. Затем 10-100 мкл полученной суспензии наносили на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашке Петри и распределяли стерильным шпателем Дригальского (Рисунок 10). Применяли плотные питательные среды: МПА+1% глюкозы+0,5 % дрожжевого экстракта и бульон сусло-агар (БСА). Культивирование проводили при температуре 30°C в течение 24-240 часов (1-10 суток). При расसेве смывов бактерий, отобранных в разных точках РС МКС, на поверхность плотных питательных сред, приходилось делать несколько вариантов рассева бактериальной суспензии – наносить на чашки разные объемы бактериальной суспензии (10-100 мкл) для получения количества колоний (КОЕ), доступного подсчету, но не дающего статистической погрешности. Кроме того, крупные колонии позволяли дифференцировать на чашках со средой разные морфотипы колоний. На рисунке 11 показаны колонии бактерий на чашках с питательной средой, полученные из точки отбора № 3 (осень, 2018 год) с применением разного объема бактериальной суспензии для рассева на чашках. Такая методика получения колоний среднего и крупного размера позволила получить характерные культуральные (макроморфологические) признаки

колоний и уже на ранних этапах микробиологического анализа предположить доминирование на РС МКС нескольких видов бактерий рода *Bacillus*. На рисунке 12 показаны колонии бацилл, полученные из пробы № 5 РС МКС (осень, 2018 год). Видно, что крупные колонии из пробы №5 (Рисунок 12) по сумме макроморфологических признаков – форма, размер, поверхность, профиль, цвет, край очень похожи на крупные колонии из пробы № 3, осень 2018 года (Рисунок 11).



Рисунок 10. Схема отбора проб на РС МКС и получение изолятов бактерий на Земле.

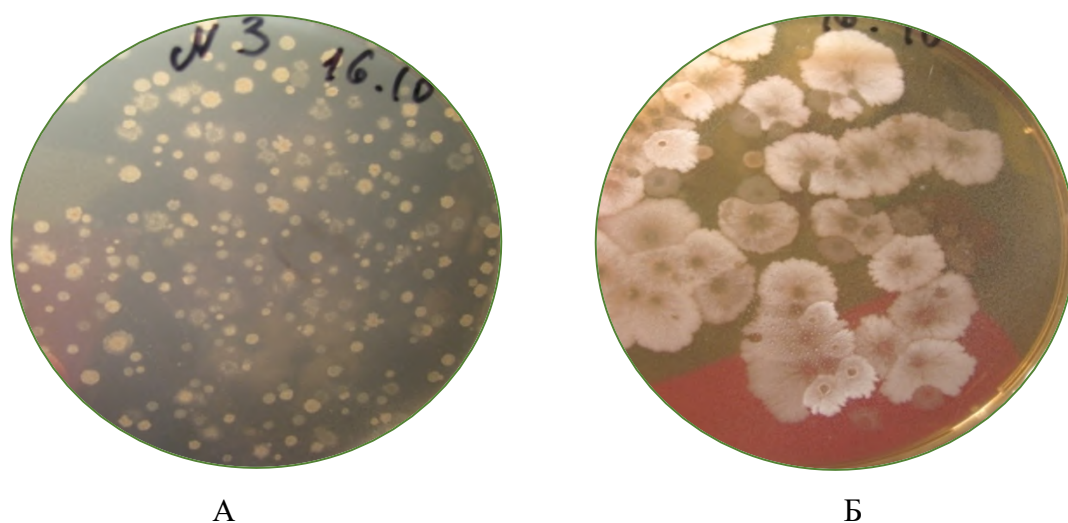


Рисунок 11. Колонии, выросшие на чашках Петри при нанесении на поверхность среды 80 мкл (А) и 20 мкл (Б) суспензии пробы № 3 (октябрь 2018).

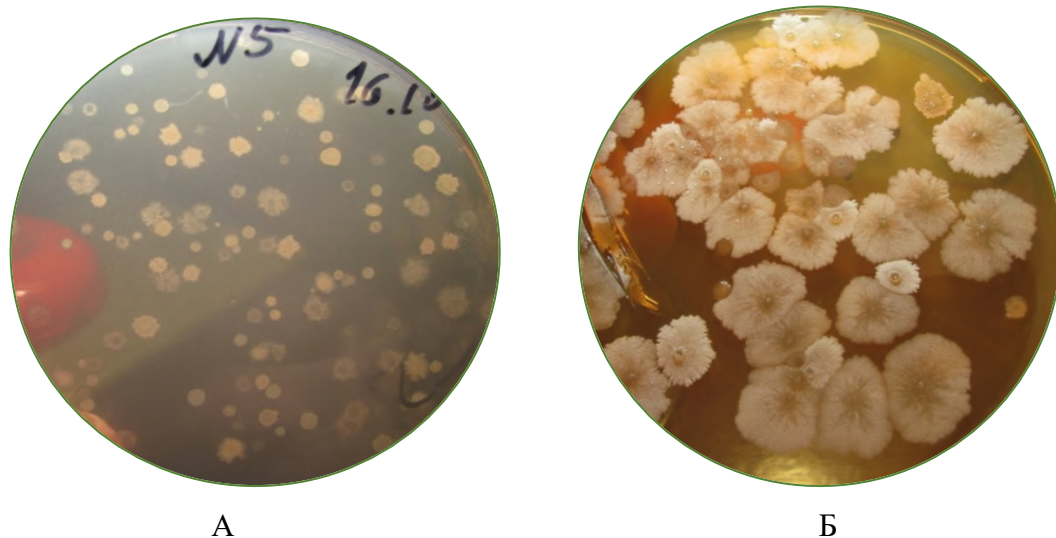


Рисунок 12. Колонии, выросшие на чашках Петри при нанесении на поверхность среды 60 мкл (А) и 20 мкл (Б) суспензии пробы № 5 (октябрь 2018).

При обработке проб, полученных с РС МКС весной и осенью 2018 года, для дифференциации колоний бактерий рода *Bacillus* от колоний бактерий других родов и физиологических групп, а также колоний дрожжей, использовали микроскопический анализ культур из колоний, культивировавшихся после посева проб в течение 3-20 суток. В препаратах «раздавленная капля» с применением фазового контраста и объектива 100х в материале колоний целью исследований, прежде всего, было обнаружение в клетках эндоспор. В сомнительных случаях или при отсутствии эндоспор на 15-20 сутки наблюдения, для стимуляции образования эндоспор колонии высевали на картофельную среду, а затем выросшая культура подвергалась микроскопическому анализу для обнаружения эндоспор. Кроме способности формировать эндоспоры, критериями отнесения той или иной бактерии к роду *Bacillus*, являлись также такие особенности, как способность расти на простых средах в аэробных условиях, подвижность клеток, их форма, взаимное расположение, размеры клеток и эндоспор, отношение к кислороду, способность эндоспор выдерживать 10 минутное кипячение с последующим высевом эндоспор на питательные среды.

В процессе анализа выросших на плотных средах колонии бактерий, которые по сумме признаков можно было отнести к бациллам, по таким характерным макроморфологическим признакам как форма, размер, поверхность, профиль, цвет, край, структура, консистенция были разделены на несколько морфотипов. Так, например, среди колоний спорообразующих бактерий, полученных из проб, доставленных из РС МКС весной и осенью 2018 года, встречалось много колоний морфотипа, представленного на рисунках 13-15. По сумме макроморфологических признаков – форма, размер, поверхность, профиль, цвет,

край, структура, консистенция, представленные на рисунках 13, 14 и 15 колонии очень похожи. В дальнейшем с помощью методов анализа генов 16S рРНК и метода MALDI-TOF была установлена принадлежность штаммов бактерий с таким морфотипом колоний сначала к виду *B. licheniformis*, а в дальнейшем использование метода полногеномного секвенирования окончательно позволило идентифицировать такие бактерии как *B. paralicheniformis* (Таблица 9).

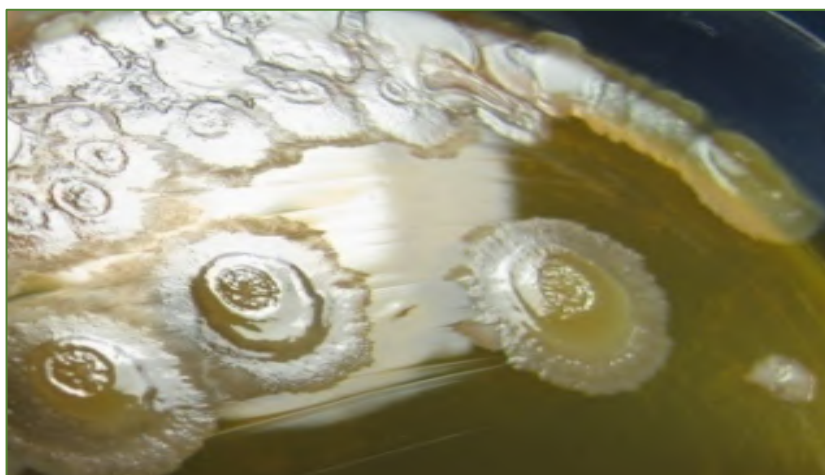


Рисунок 13. Колонии чистой культуры спорообразующей бактерии *B. paralicheniformis*, выделенной из пробы № 24 РС МКС (весна 2018).



Рисунок 14. Колонии чистой культуры спорообразующей бактерии *B. paralicheniformis*, выделенной из пробы № 12 РС МКС (осень 2018).

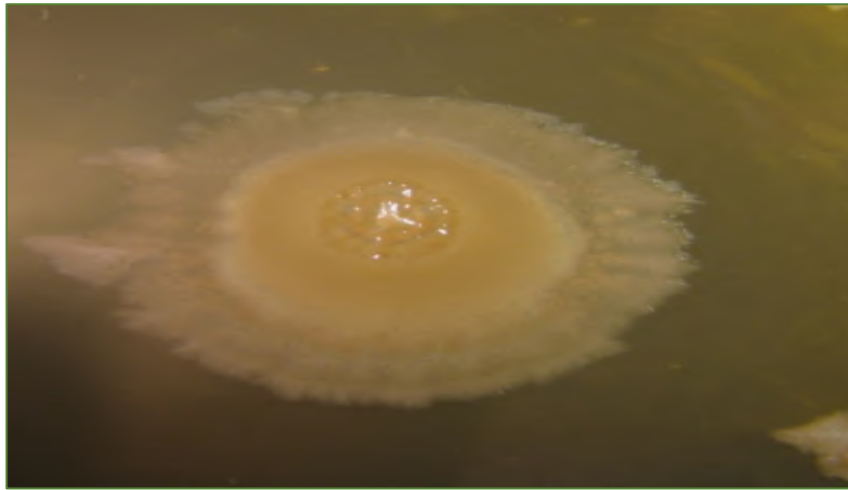


Рисунок 15. Колонии чистой культуры спорообразующей бактерии *B. paralicheniformis*, выделенной из пробы № 23 РС МКС (осень 2018).

Однако, кроме бактерий рода *Bacillus*, формирующих в основном крупные колонии, на чашках встречались и сравнительно мелкие колонии бактерий других физиологических групп. Эти колонии принадлежали в основном бактериям родов *Escherichia*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mixta* и некоторым другим. Встречались в небольшом количестве также колонии дрожжей. Некоторые из изолятов этих видов бактерий и дрожжей отсеяны, очищены и идентифицированы нами с применением таких методов идентификации микроорганизмов, как анализ гена 16S рРНК и метод MALDI-TOF MS, но в данную работу результаты этих исследований не включены.

6.3. Общее количество бактерий на поверхностях оборудования РС МКС

Существует специальный документ, который устанавливает пределы допустимого микробного загрязнения проб воздуха, воды и поверхностей МКС в предполетном и полетном режимах, которым руководствуются во всем мире, в том числе в РФ. Это требования к медицинским операциям Международной космической станции (NASA preflight and in-flight acceptability limits for air, water, and surface samples (International Space Station Medical Operations Requirements Document (ISS MORD)). Согласно этому документу, предполетный режим допускает наличие на поверхностях оборудования допустимого верхнего (максимального) предела КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см² поверхности в 500 КОЕ (Таблица 3). Однако в полетном режиме верхний предел общей бактериальной обсемененности поверхностей оборудования согласно ISS MORD повышается в 20 раз и составляет уже 10000 КОЕ бактерий/100 см². Это говорит о том, что возможности поддержания чистоты поверхностей оборудования в полетном режиме по сравнению с предполетным режимом резко ограничены условиями МКС, где не допускается применение УФ-облучения и газообразных антисептиков.

Однако, как видно из полученных нами данных (Таблицы 4, 5), общее количество КОЕ бактерий на поверхности оборудования ни в одной из точек контроля на РС МКС весной и осенью 2018 года на площади 100 см² не превышало норматива, установленного ISS MORD NASA для поверхностей оборудования МКС в полетном режиме работы, который не должен превышать 10000 КОЕ/100 см² (Таблица 3).

Весной 2018 г. из 26 точек отбора проб бактерии всех физиологических групп на среде МПА + 1% глюкозы + 1% дрожжевого экстракта были обнаружены в 12 точках из 26 (7 основных и 5 дополнительных точек). Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 0 до 2520 КОЕ/100 см² (Таблица 4). Максимальное количество КОЕ бактерий всех физиологических групп – 2520 было обнаружено в точке отбора (пробе) №17, что в 4 раза ниже верхнего предела в 10000 КОЕ/100 см², разрешенного для полетного режима документом ISS MORD NASA (Таблица 3).

Осенью 2018 г. бактерии на РС МКС были обнаружены уже в 23 точках отбора. Сравнение наличия и количества бактерий точек отбора проб на РС МКС весной и осенью 2018 года показало, что осенью количество точек, из которых были выделены бактерии, по сравнению с весной 2018 года увеличилось в 2 раза (Таблица 5). Осенью 2018 г. из 26 точек отбора проб бактерии всех физиологических групп на среде МПА + 1% глюкозы + 1% дрожжевого экстракта были обнаружены в 23 точках из 26 (20 основных и 6 дополнительных). Общее количество КОЕ/100 см² бактерий всех физиологических групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 0 до 2940 КОЕ/100 см² (Таблица 5). Максимальное количество КОЕ бактерий всех групп /100 см² – 2940 КОЕ было обнаружено в точке отбора (пробе) №1. Это максимальное количество КОЕ в точке №1 почти в 4 раза ниже верхнего предела в 10000 КОЕ/100 см², разрешенного для полетного режима документом ISS MORD NASA (Таблица 3).

Таблица 3. Пределы допустимого микробного загрязнения проб воздуха, воды и поверхностей перед полетом и в полете. (International Space Station Medical Operations Requirements Document, ISS MORD).

Sample	Air	Surface	Water
Preflight	300 CFU m ⁻³ Bacteria	500 CFU 100 sm ⁻² Bacteria	50 CFU mL ⁻¹
	50 CFU m ⁻³ Fungi	10 CFU 100 sm ⁻² Fungi	No detectable coliforms
In flight	1,000 CFU m ⁻³ Bacteria	10,000 CFU 100 sm ⁻² Bacteria	50 CFU mL ⁻¹
	100 CFU m ⁻³ Fungi	100 CFU 100 sm ⁻² Fungi	No detectable coliforms

6.4. Бактерии рода *Bacillus* на поверхностях оборудования РС МКС

Такие особенности клеток бактерий из колоний, полученных рассевом проб из РС МКС, как способность формировать эндоспоры, подвижность, форма и размеры клеток и эндоспор, отношение к кислороду, способность выдерживать 10 минутное кипячение позволили с большой вероятностью позволяли отнести их к роду *Bacillus*. Это предположение получило в дальнейшем подтверждение тем, что практически все изоляты бактерий, предположительно отнесенные нами по сумме перечисленных признаков к бациллам, в дальнейшем отнесены к бациллам также с помощью таких методов идентификации, как анализ гена 16S рРНК и MALDI-TOF MS.

Из 26 точек отбора проб весной 2018 года бактерии всех физиологических типов на среде МПА+1% глюкозы+1% дрожжевого экстракта были обнаружены в 12 точках отбора проб из 26 (в 7 основных и в 5 дополнительных точках). Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 0 до 2520 КОЕ/100 см² (Таблица 4). Бациллы обнаружены в 11 точках отбора проб – 4, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26. В пробах, полученных из точки отбора №11, бактерии рода *Bacillus* не обнаружены. В точках с максимальным количеством бацилл – 4, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23 и 24 количество их КОЕ/100 см² составляло 1446, 1826, 1640, 2520, 2140, 1688, 2040, 1678 и 1980 соответственно (Таблица 4). При этом количество КОЕ бацилл/100 см² от общего количества бактерий всех групп/100 см² составляло, в зависимости от точки отбора от 26% в точке 15 до 65% в точке 24 (Таблица 4).

Из 26 точек отбора проб осенью 2018 года бактерии всех физиологических групп на среде МПА+1% глюкозы+1% дрожжевого экстракта были обнаружены в 23 точках из 26

(в 20 основных и в 6 дополнительных) (Таблица 5). Общее количество КОЕ/100 см² бактерий всех физиологических групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 0 до 2940 КОЕ/100 см². В точках с максимальным количеством бактерий – 1, 3, 4, 5, 8, 12 и 13 количество КОЕ бактерий /100 см² составляло 1029, 1002, 795, 436, 236, 424 и 625 соответственно (Таблица 5). При этом количество КОЕ бактерий/100 см² от общего количества бактерий всех групп /100 см² составляет, в зависимости от точки отбора от 25% в точке 8 до 76% в точке 11.

Таблица 4. Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см² и количество КОЕ бактерий на 100 см² от КОЕ бактерий всех групп на 100 см² (в %) в пробах из РС МКС (весна 2018 года) при высеве образцов на МПА + 1% глюкозы + 1% дрожжевого экстракта.

№ пробы	Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см ²	КОЕ бактерий на 100 см ² от КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см ² (в %).
Основные точки отбора проб		
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1446±82	417±22 (29%)
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	156±11	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	1826±46	473±23 (26%)
16	1640±42	1016±52 (62%)
17	2520±116	1436±90 (57%)
18	2140±86	856±48 (40%)
19	1688±62	907±54 (54%)
20	0	0
Дополнительные точки отбора проб		
21	0	0
22	2040±76	1142±56 (56%)
23	1678±66	907±46 (54%)
24	1980±78	1287±67 (65%)
25	240±16	101±7 (42%)
26	280±17	174±10 (62%)

Таблица 5. Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см² и количество КОЕ бацилл на 100 см² от КОЕ бактерий всех групп на 100 см² (в %) в пробах из РС МКС (осень 2018 года) при высеве образцов на МПА+1% глюкозы+1% дрожжевого экстракта.

№ пробы	Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см ²	КОЕ бацилл на 100 см ² от КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см ² (в %).
Основные точки отбора проб		
1	2940±134	1029±42 (35%)
2	244±12	68±5 (28%)
3	2780±134	1002±38 (36%)
4	1940±82	795±42 (41%)
5	1285±72	436±28 (34%)
6	640±38	224±16 (35%)
7	0	0
8	946±46	236±12 (25%)
9	380±21	106±8 (28%)
10	0	0
11	280±11	212±8 (76%)
12	1180±49	424±15 (36%)
13	1490±69	625±34 (42%)
14	280±12	184±10 (66%)
15	486±26	126±8 (26%)
16	320±21	80±6 (25%)
17	384±22	100±5 (26%)
18	288±14	134±8 (46%)
19	244±16	121±6 (50%)
20	126±8	62±5 (49%)
Дополнительные точки отбора проб		
21	122±8	64±5 (52%)
22	120±7	60±5 (50%)
23	248±19	128±7 (51%)
24	128±9	63±5 (49%)
25	0	0
26	366±18	241±16 (66%)

Как уже указывалось, сравнение наличия и количества бактерий точек отбора проб на РС МКС весной и осенью 2018 года показало, что осенью количество точек, из которых были выделены бактерии, по сравнению с весной 2018 года увеличилось в 2 раза. Кроме того, количество и разнообразие колоний бактерий на поверхности питательных сред из точек отбора осенью было больше, чем весной (Таблицы 4 и 5). Так бактерии рода *Bacillus* весной 2018 года в точках, где они были обнаружены, обычно представлены 1-2 морфотипами колоний, а осенью 2018 года в точках отбора часто наблюдали по 2-4 морфотипа колоний бацилл. В целом следует отметить, что количество типов колоний и, соответственно, видов бацилл на РС МКС, оказалось относительно небольшим. Что касается других

видов бактерий на РС МКС, то из идентифицированных нами в дальнейшем с помощью анализа гена 16S рPHK и MALDI-TOF MS видов (в работу эти результаты не вошли) следует отметить *Anaerococcus* sp., *Acinetobacter johnsonii*, *E. coli*, *Enterococcus durans*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus* sp.

6.5. Общее количество бактерий на поверхностях оборудования больничной лаборатории.

Любая обитаемая среда на Земле, в которой люди проводят большую часть своего времени, характеризуется определенным микробным сообществом. Воздушное пространство и рабочие поверхности большинства рабочих помещений подвергаются очистке от микроорганизмов с помощью систем естественной вентиляции и влажной уборки с применением моющих веществ. Только в некоторых специальных помещениях – операционных, родильных отделениях, палатах интенсивной терапии, лабораториях для отбора проб крови, асептических комнатах для производства медицинских препаратов количество микроорганизмов в воздухе и на поверхностях оборудования поддерживается на минимальном уровне с помощью бактериальных фильтров, ультрафиолетового облучения и дезинфицирующих растворов.

Одним из видов таких асептических помещений являются лабораторные комнаты для отбора проб крови. Эти помещения являются агрессивной для микроорганизмов средой обитания в связи с постоянным воздействием УФ-излучения и регулярным использованием различных дезинфицирующих средств. В основе микробной контаминации таких помещений лежит постоянный приток новых посетителей, как правило, подвергающихся лечению антибиотиками и имеющих низкий иммунный статус. В результате на рабочих поверхностях лабораторных комнат выживают штаммы бактерий, устойчивых к дезинфицирующим растворам и часто обладающие множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (Nikaido 2009). Резистентные к УФ-излучению и дезинфицирующим средствам, чаще всего спорообразующие бактерии, способны вызывать множество заболеваний у человека. Так установлено, что бактерии рода *Bacillus* являются возбудителями многих заболеваний, особенно у людей со сниженным иммунитетом (Farrar, Reboli, 2006; Ehling-Schulz et al., 2019; Bianco et al., 2021). Однако информации о клинических характеристиках бактерий, обитающих в чистых комнатах и асептических помещениях, еще очень мало. Задачей этой части работы являлось выделение из смывов рабочих поверхностей оборудования больничной лаборатории для отбора проб крови аэробных бактерий разных физиологических групп, отбор среди них изолятов бактерий рода *Bacillus* и их идентификация до вида.

6.6. Получение и характеристика первичных изолятов бактерий из больничной лаборатории

Исследовали бактерии, выделенные из смывов рабочих поверхностей оборудования больничной лаборатории, предназначенной для отбора проб крови. Отбор проб, получение изолятов и чистых культур, выполняли аналогично забору и анализу проб из Российского сегмента международной космической станции (Рисунок 10). Для определения количества бактерий на поверхностях оборудования больничной лаборатории осуществляли смывы с рабочих поверхностей этого оборудования в 14 точках отбора. Пробы отбирали с поверхностей оборудования утром через 10 мин после ночного УФ-облучения и утренней антисептической обработки рабочих поверхностей дезрастворами смывом в площади 100 см^2 с использованием ватных палочек.

Культивирование расеев на чашках проводили при температуре 30°C в течение 24-240 часов (1-10 суток). При расее смывов бактерий, отобранных с поверхности оборудования в разных точках больничной лаборатории, на плотные питательные среды, приходилось, как и при работе со смывами с МКС, делать несколько вариантов расеев бактериальной суспензии – наносить на чашки разные объемы бактериальной суспензии (10-100 мкл) для получения количества колоний (КОЕ), доступного подсчету, но не дающего статистической погрешности.

Из 14 точек отбора проб бактерии всех физиологических типов на среде МПА+1% глюкозы+1% дрожжевого экстракта были обнаружены во всех 14 точках (Таблица 6). Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 60 КОЕ/100 см^2 в точке отбора 10 до 380 КОЕ/100 см^2 в точке отбора 9 (Таблица 6). Сравнение результатов посева на аналогичные питательные среды проб, доставленных с РС МКС и больничной лаборатории показало, что на борту РС МКС максимальное количество бактерий всех физиологических групп в точках отбора в среднем на порядок превышает количество бактерий на поверхностях оборудования больничной лаборатории (Таблица 4, 5).

Этот результат посева проб из больничной лаборатории, в сравнении с РС МКС, можно объяснить тем, что возможности поддержания микробиологической чистоты рабочих поверхностей оборудования на РС МКС и в больничной лаборатории кардинально различаются. В космосе, в отличие от больничной лаборатории, невозможна обработка поверхностей с помощью УФ-облучения, токсичных или газообразных дезрастворов. Кроме того, имеют значение также большие отличия в сложности оборудования РС МКС и больничной лаборатории для отбора проб крови. На РС МКС имеются места и приборы, малодоступные или недоступные для процесса антимикробной обработки.

Таблица 6. Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на 100 см² и количество КОЕ бацилл на 100 см² от КОЕ бактерий всех групп на 100 см² (в %) в пробах из больничной лаборатории при высеве образцов на МПА+1% глюкозы+1% дрожжевого экстракта.

№ пробы	Общее количество КОЕ бактерий всех групп на 100 см ²	КОЕ бацилл на 100 см ² от КОЕ бактерий всех групп на 100 см ² (в %).
1	274±13	209±18 (76%)
2	230±15	168±15 (73%)
3	118±12	80±7 (68%)
4	174±10	95±6 (55%)
5	285±19	166±8 (58%)
6	340±28	224±16 (65%)
7	180±12	120±10 (66%)
8	146±12	126±12 (86%)
9	380±21	286±28 (75%)
10	60±8	0
11	260±16	212±8 (82%)
12	180±14	124±15 (69%)
13	66±5	45±3 (68%)
14	142±12	124±10 (87%)

При обработке проб, полученных из больничной лаборатории для дифференциации колоний бактерий рода *Bacillus* от колоний бактерий других родов, физиологических групп или колоний дрожжей, использовали микроскопический анализ колоний, культивировавшихся после посева проб в течение 3-20 суток. В препаратах «раздавленная капля» с применением фазового контраста и объектива 100х в материале колоний целью исследований, прежде всего, было обнаружение эндоспор. В сомнительных случаях или при отсутствии эндоспор на 15-20 сутки наблюдения, для стимуляции образования эндоспор колонии высевали на картофельную среду, а затем выросшая культура подвергалась микроскопическому анализу для обнаружения эндоспор. Кроме способности формировать эндоспоры, критериями отнесения той или иной бактерии к роду *Bacillus* являлись также такие особенности культур бактерий, как способность расти на простых средах в аэробных условиях, подвижность клеток, их форма, взаимное расположение, размеры клеток и эндоспор, отношение клеток к кислороду, способность эндоспор выдерживать 10 минутное

кипячение с последующим прорастанием при высеве на плотные питательные среды. Затем колонии бактерий, которые по перечисленным выше критериям можно было предположительно отнести к бациллам, разделили на несколько характерных морфотипов по таким характерным макроморфологическим признакам, как форма колонии, размер, поверхность, профиль, цвет, край, структура, консистенция.

Чаще всего в посевах пробах по набору таких макроморфологических признаков, как форма, размер, поверхность, профиль, цвет, край, структура, консистенция встречались колонии нескольких основных морфотипов. Например, на рисунке 16 представлены колонии чистой культуры из пробы № 9. Эта культура в дальнейшем была идентифицирована методами 16S рPHK и MALDI-TOF MS как *Bacillus subtilis* HSA06. На рисунке 17 представлены колонии чистой культуры из пробы № 14. Эта культура в дальнейшем была идентифицирована методом полногеномного секвенирования как *Bacillus cereus* HSA01.



Рисунок 16. Колонии чистой культуры спорообразующей бактерии *B. subtilis* HSA01, выделенной из пробы № 9 больничной лаборатории.

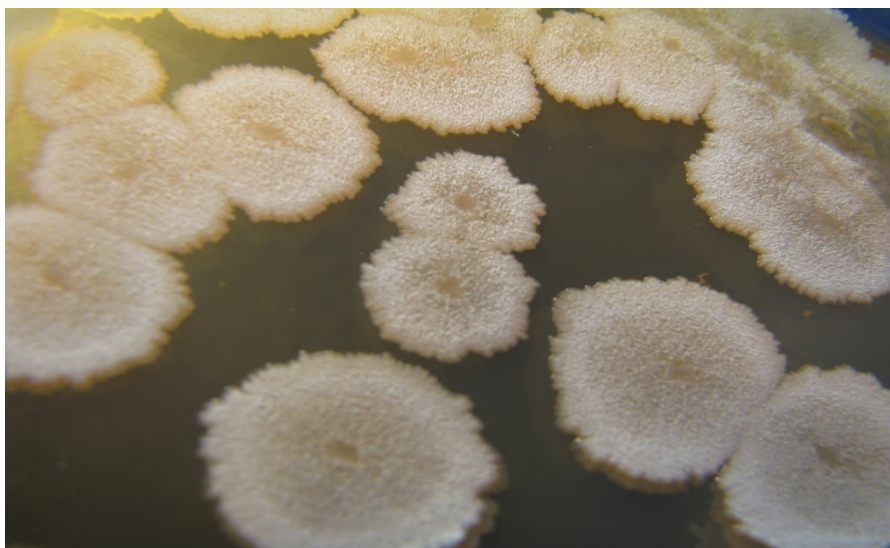


Рисунок 17. Колонии чистой культуры спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* HSA06, выделенной из пробы № 14 больничной лаборатории.

Однако, кроме бактерий рода *Bacillus*, формирующих в основном крупные колонии, на чашках встречались и сравнительно мелкие колонии бактерий других физиологических групп. Эти колонии принадлежали в основном бактериям родов *Escherichia*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* и некоторых других родов. Встречались в небольшом количестве также колонии дрожжей. Некоторые из изолятов этих видов бактерий и дрожжей были отсеяны, очищены и идентифицированы нами с применением анализа гена 16S рРНК и методики MALDI-TOF MS, но в данную работу результаты этих исследований не включены.

6.7. Бактерии рода *Bacillus* на поверхностях оборудования больничной лаборатории

Бациллы в больничной лаборатории обнаружены в 13 точках отбора проб из 14. В пробах, полученных из точки отбора № 11, бактерии рода *Bacillus* не обнаружены. В точках с максимальным количеством бацилл – 1, 2, 5, 6, 9, 11 количество их КОЕ/100 см² составляло 274, 230, 285, 340, 380, и 260 соответственно (Таблица 6). При этом количество КОЕ бацилл/100 см² от общего количества бактерий всех групп на 100 см² составляет, в зависимости от точки отбора, от 55% в точке 4 до 87% в точке 14.

Сравнение количества бацилл к общему количеству бактерий всех физиологических групп в точках отбора проб на РС МКС (Таблицы 4, 5) и в больничной лаборатории показало большее относительное количество бацилл в пробах из больничной лаборатории (Таблица 6). Это можно объяснить тем, что в лаборатории, как уже было отмечено, в отличие от РС МКС, антимикробная обработка может проводиться с использованием ночного УФ-облучения и большого спектра дезрастворов. В результате этого соотношение выживших микроорганизмов на поверхностях оборудования больничной лаборатории сме-

щается в сторону тех форм, которые способны формировать эндоспоры и меньше подвержены воздействию УФ-облучения и дезрастворов.

6.8. Идентификация штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных с РС МКС и больничной лаборатории

6.8.1. Идентификация штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных с РС МКС

В ходе настоящей работы были использованы штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные ранее и идентифицированные до вида с помощью молекулярных методов как *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, а также 28 новых штамма бацилл, выделенные из проб, полученных из РС МКС и больничной лаборатории и идентифицированных уже в ходе настоящей работы.

После рассева проб, полученных из РС МКС и получения колоний бактерий всех физиологических групп на плотных питательных средах, эти колонии анализировали для выбора колоний бактерий, предположительно относящихся к роду *Bacillus*. Для этого определяли макроморфологические свойства культур – форма, размер, поверхность, профиль, цвет, край. В процессе рассева с целью очистки культур определяли структуру и консистенцию выбранных для изучения колоний. Далее у культур, предположительно относящихся к роду *Bacillus*, проводили ряд исследований по определению микроморфологических, некоторых культуральных и физиолого-биохимических признаков (Таблицы 7, 8). Определяли в суточных культурах отношение клеток к окраске по Граму, подвижность клеток, их форму и размер, наличие в клетках эндоспор и форму эндоспор при росте на картофельной среде, наличие параспоральных кристаллов, каталазной активности, отношение культур к кислороду, способность образовывать кислоту при росте на глюкозе.

Следует отметить, что практически все изоляты бактерий, выделенные из проб, доставленных из РС МКС и предположительно относящиеся к роду *Bacillus*, по набору макроморфологических (колонии), микроморфологических, некоторых культуральных и физиолого-биохимических признаков (Таблицы 7, 8) в результате идентификации этих штаммов до вида с применением в дальнейшем молекулярных методов были отнесены к роду *Bacillus* (Таблица 9).

Таблица 7. Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб, доставленных из РС МКС.

Параметр	Штамм бактерий																		
	SE 12	SE 21	SE 41	SE 42	SE 43	SE 4	SE 62	SE 71	SE 131	SE 132	SE 15	SE 161	SE 171	SE 17	SE 181	SE 182	SE 183	SE 191	SE 192
В молодых культурах палочковидные	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Окраска по Граму	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Диаметр клетки > 1 мкм	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Споры округлые	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Споры овальные	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Спора изменяет форму клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Параспоральные кристаллы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Факультативные анаэробы	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Облигатные аэробы	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Образование кислоты при росте на глюкозе	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Далее с применением молекулярных методов практически все новые штаммы ба-цилл, выделенные с РС МКС, удалось идентифицировать до рода и вида (Таблица 9). До вида не удалось идентифицировать только *Bacillus* sp. SE132. Для идентификации культур бактерий, выделенных с РС МКС, до вида в основном использовались методы анализа генов 16S рРНК и MALDI-TOF. Метод полногеномного секвенирования применялся с целью идентификации только тех штаммов, для которых не удавалось получить результат идентификации методами анализа 16S рРНК и MALDI-TOF. Кроме того, полногеномное секвенирование применяли как для идентификации культур бактерий рода *Bacillus*, выделенных из РС МКС и больничной лаборатории, так и с целью выявления у этих штаммов генов устойчивости к антибиотикам.

Таблица 8. Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб, доставленных из РС МКС и больницы лаборатории.

Параметр	Штамм бактерий												
	LR2H G21	HEP 3B2	PW N2D	DLA 64	SE 15	SE 21	SE 171	SE 192	HSA 01	HSA 03	HSA 12	HSA 06	HSA 09
В молодых культурах палочковидные	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Окраска по Граму	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Диаметр клетки > 1 мкм	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Споры округлые	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Споры овальные	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Спора изменяет форму клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Параспоральные кристаллы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Факультативные анаэробы	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+		+
Облигатные аэробы	-	+		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Образование кислоты при росте на глюкозе	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Некоторые из штаммов бацилл, выделенные из проб, доставленных с РС МКС, идентифицировать до конкретного вида с помощью только анализа 16S рРНК не удалось, так как последовательности гена 16S рРНК у этих штаммов оказались одновременно близки к нескольким видам рода *Bacillus*. Эти «космические» штаммы были обозначены как *Bacillus* sp. LR2HG21, *Bacillus* sp. HEP3B2, *Bacillus* sp. PWN2D, *Bacillus* sp. DLA64, *Bacillus* sp. SE15, *Bacillus* sp. SE21, *Bacillus* sp. SE171, *Bacillus* sp. SE192 и в дальнейшем идентифицированы до вида с помощью MALDI-TOF и/или полногеномного секвенирования. При этом несколько «космических» штаммов бактерий рода *Bacillus* – SE21, SE41, SE71, SE161, SE183 не удалось идентифицировать до вида и методом MALDI-TOF. Это было сделано только с помощью полногеномного секвенирования (Таблица 9). Очень важно было подтвердить с помощью секвенирования принадлежность некоторых штаммов к условно-патогенному виду *B. cereus*. Так, результаты секвенирования подтвердили принадлежность идентифицированных методом MALDI-TOF штаммов SE42 и SE43 к виду *B. cereus*.

Таблица 9. Идентификация штаммов бактерий, выделенных из проб, полученных на РС МКС и в больничной лаборатории анализом генов 16S рРНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования.

№	Штамм	16S рРНК	MALDI-TOF MS	Полногеномное секвенирование
1	<i>B. amyloliquefaciens</i> SE41	-	+	+
2	<i>B. amyloliquefaciens</i> PWN2D	+	-	+
3	<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	+	+	-
4	<i>B. cereus</i> SE42	-	+	+
5	<i>B. cereus</i> SE43	-	+	+
6	<i>B. cereus</i> LR2HG21	+	+	+
7	<i>B. cereus</i> HSA01	+	+	+
8	<i>B. cereus</i> HSA03	+	+	+
9	<i>B. cereus</i> HSA12	+	+	+
10	<i>B. licheniformis</i> 7-12	+	-	-
11	<i>B. licheniformis</i> KM МГУ 14	+	-	-
12	<i>B. paralicheniformis</i> SE71	-	+	+
13	<i>B. paralicheniformis</i> SE131	-	+	+
14	<i>B. paralicheniformis</i> SE161	-	+	+
15	<i>B. paralicheniformis</i> SE181	-	+	+
16	<i>B. paralicheniformis</i> SE182	-	+	+
17	<i>B. paralicheniformis</i> SE183	-	+	+
18	<i>B. pumilus</i> 8-12	+	-	-
19	<i>B. pumilus</i> KM МГУ 364	+	-	-
20	<i>B. pumilus</i> SE4	-	+	-
21	<i>B. pumilus</i> SE191	-	+	-
22	<i>B. safensis</i> HEP3B2	+	-	+
23	<i>B. safensis</i> SE21	+	+	+
24	<i>B. safensis</i> SE192	+	+	+
25	<i>B. subtilis</i> 14-12	+	-	-
26	<i>B. subtilis</i> KM МГУ 25	+	-	-
27	<i>B. subtilis</i> DLA64	+	+	-
28	<i>B. subtilis</i> HSA06	+	+	-
29	<i>B. subtilis</i> SE12	-	+	-
30	<i>B. subtilis</i> SE62	-	+	-
31	<i>B. subtilis</i> SE15	+	+	+
32	<i>B. subtilis</i> SE17	-	+	-
33	<i>B. subtilis</i> SE171	+	+	+
34	<i>Bacillus</i> sp. SE132	-	+	-

Примечание: Знак «-» означает, что такой метод идентификации не применялся.

В процессе работы нам удалось выделить из проб, доставленных с РС МКС три штамма бацилл, принадлежащих к виду *B. safensis*. Это штаммы *B. safensis* HEP3B2, *B. safensis* SE21, *B. safensis* SE192 (Таблица 9, Рисунок 18). Этот вид бацилл является уникальным в том, что тринадцать штаммов нового вида бацилл *B. safensis* были впервые выделены с поверхностей космических аппаратов в Космическом центре Кеннеди во Флориде. Типовой штамм *Bacillus safensis* JPL-MERTA-8-2 (Рисунок 19) получил свое название

от названия завода по сборке космических аппаратов JPL (Masataka et al., 2006). *B. safensis* JPL-MERTA-8-2 обладает высокой устойчивостью к солям и ультрафиолетовому излучению и способен хорошо расти в условиях МКС (Coil et al., 2016; Kothari et al., 2016).

На МКС были посланы 48 штаммов бактерий для эксперимента по изучению скорости роста этих бактерий в космосе. В ходе этого эксперимента условия микрогравитации и космическая радиация на борту МКС не повлияли на рост большинства протестированных бактерий. И только один штамм бактерий – *B. safensis* JPL-MERTA-8-2 рос в космосе на 60% быстрее, чем на Земле (Coil et al., 2016)



Рисунок 18. *Bacillus safensis* SE192 с РС МКС



Рисунок 19. *Bacillus safensis* JPL-MERTA-8-2 (Masataka et al., 2006).

Важно отметить, что штаммы видов *B. pumilus* и *B. safensis*, обнаруженные нами на РС МКМ (Таблица 9) очень близки из-за их 99,5% сходства в последовательностях генов 16S рРНК и только метод полногеномного секвенирования позволил идентифицировать эти виды, как отдельные. Группа видов бацилл, близкородственных с *B. pumilus*, содержит пять родственных видов: *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* и *B. aerophilus* (Tirumalai et al., 2018). Следовательно, обнаруженные на РС МКС штаммы видов *B. pumilus* 8-12, *B. pumilus* SE4, *B. pumilus* SE191 и *B. safensis* НЕР3В2, *B. safensis* SE21, *B. safensis* SE192 являются представителями двух близкородственных видов (Таблица 9).

Штаммы *B. safensis* были случайно занесены на Марс на поверхности космических аппаратов из-за загрязнения этих аппаратов в чистых помещениях на Земле (сборочных цехах космических аппаратов). Загрязнение чистых помещений во время сборки космических аппаратов является в наше время предметом особой озабоченности, поскольку это может мешать микробиологическим экспериментам в космосе и приводить к ложным выводам при осуществлении предстоящих в ближайшем будущем миссий по обнаружению форм микробной жизни на других планетах (Masataka et al., 2006).

Установлено также, что штаммы бацилл из РС МКС, идентифицированные методом MALDI-TOF как *B. licheniformis* SE131, SE181, SE182, с помощью полногеномного секвенирования были отнесены к *B. paralicheniformis* SE131, SE181, SE182. Кроме того, штаммы *Bacillus* sp. SE71, SE161, SE183 по результатам полногеномного секвенирования также идентифицированы как *B. paralicheniformis* SE71, SE161, SE183 (Таблица 9).

Таким образом, в процессе идентификации штаммов бацилл, выделенных с РС МКС, с использованием метода полногеномного секвенирования было обнаружено 6 штаммов относительно нового вида *B. paralicheniformis* (Таблица 9). Впервые *Bacillus paralicheniformis* sp. nov. был выделен из корейской соевой пасты в 2015 году (Dunlap et al., 2015). Анализ гена 16S рРНК показал близкое сходство нового штамма с *Bacillus sonorensis* (99,5 % сходство) и *Bacillus licheniformis* (99,4 % сходство). Однако сравнительный фенотипический анализ жирных кислот *B. sonorensis* и *B. licheniformis* позволил выделить новый штамм из корейской соевой пасты уже в отдельный вид *Bacillus paralicheniformis* KJ-16^T. (Dunlap et al., 2015).

Следовательно, как и в случае с видами *B. pumilus* и *B. safensis*, виды *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* являются на РС МКС представителями двух близкородственных видов (Таблица 9).

6.8.2. Идентификация штаммов бактерий, полученных из больничной лаборатории

Пробы, полученных из больничной лаборатории, рассеивали на плотные питательные среды для получения колоний бактерий. Колонии всех физиологических групп анализировали с целью выбора бактерий, предположительно относящихся к роду *Bacillus*. Для этого определяли макрофологические свойства колоний – форма, размер, поверхность, профиль, цвет, край. В процессе очистки культур определяли структуру и консистенцию выбранных для изучения колоний. Затем у изолятов культур, предположительно относящихся к роду *Bacillus*, определяли микроморфологические, некоторые культуральные и физиолого-биохимические признаки (Таблица 8). Определяли в суточных культурах отношение клеток к окраске по Граму, их подвижность, форму и размер, наличие в клетках и форму эндоспор при росте на картофельной среде, наличие параспоральных кристаллов, каталазной активности, отношения к кислороду, способность образовывать кислоту при росте на глюкозе. В процессе получения изолятов бактерий по макроморфологическим (колонии) и микроморфологическим характеристикам из двадцати изолятов медицинской лаборатории были отобраны пять, доминирующих по частоте встречаемости морфотипов их колоний на плотных средах. Это изоляты HSA01, HSA03, HSA06, HSA09, HSA12. Все эти изоляты бактерий, выделенные из проб, доставленных из больничной лаборатории и предположительно относящиеся к роду *Bacillus* по макроморфологическим, микроморфологическим и некоторым физиолого-биохимическим особенностям, в результате идентификации до вида с применением молекулярных методов были отнесены к роду *Bacillus* (Таблица 9).

Затем изоляты HSA01, HSA03, HSA06, HSA09, HSA12 были определены до вида с помощью анализа 16S рПНК, как *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09. Такой же результат идентификации до вида для этих штаммов был получен с помощью MALDI-TOF MS (Таблица 9). Поскольку эти условно-патогенные виды показали устойчивость к антибиотикам, то было осуществлено также полногеномное секвенирование штаммов *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, HSA06 с целью подтверждения результатов их идентификации анализом гена 16S рПНК и методом MALDI-TOF, а также с целью определения генетических детерминант резистентности к антибиотикам у этих штаммов. Результаты идентификации культур *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, HSA06 до вида, которая была осуществлена анализом последовательностей 16S рПНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования, полностью совпали (Таблица 9).

Таким образом, с использованием анализа гена 16S рПНК, методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлена принадлежность 31 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенные из РС МКС и медицинской лаборатории, всего к семи видам этого

рода – *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (Таблица 9). При этом виды *B. pumilus* и *B. safensis*, а также виды *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* являются на РС МКС представителями двух близкородственных видов (Таблица 9).

6.9. УФ-облучение эндоспор *B. licheniformis*

Было показано, что бациллы являются наиболее часто выделяемыми микроорганизмами в образцах, полученных как с рабочих поверхностей космических станций в космосе, так и с поверхностей оборудования сборочных цехов космических аппаратов (La Duc et al., 2003; 2004; Masataka et al., 2006; Coil et al., 2016; Kothari et al., 2016). Отбор устойчивых бактерий этой группы еще в сборочных цехах космических аппаратов объясняется такими свойствами бацилл, как их олиготрофность и способность к спорообразованию, а также низкая влажность и постоянная температура в цехах. Вероятно, штаммы *B. pumilus* присутствовали на оборудовании станции в форме метаболически дремлющих спор, устойчивых к отсутствию или недостаточному питанию, обезвоживанию, воздействию H_2O_2 , УФ и гамма-облучениям, химической дезинфекции (Nicholson et al., 2000).

Мониторинг микробного разнообразия оборудования космических аппаратов на орбите Земли еще в течение 1999-2004 годов показал, что доминирующим видом среди аэробных спорообразующих бактерий являлись *B. licheniformis*, а вторым – *B. pumilus* (La Duc et al., 2004). Наши результаты также показали, что одним из доминирующих видов бацилл на РС МКС являются *B. pumilus* и *B. licheniformis* (Таблица 9). Но наиболее изученным оказался *B. pumilus*, поскольку изоляты *B. pumilus* преобладали еще на стадиях сборки космических аппаратов (La Duc et al., 2003; 2004). *B. pumilus* широко представлен в окружающей среде, этот вид можно выделить из растений, почв, поверхностей окружающей среды и даже из базальтов в пустынях (Benardini et al., 2003). Оказалось, что штаммы этой бактерии показали очень высокую устойчивость к H_2O_2 (Kempf et al., 2005). Вегетативные клетки и споры штаммов *B. pumilus* выдерживают воздействие 5% раствора H_2O_2 в течение 50-60 мин в отличие от типового штамма *B. pumilus* ATCC 7061. При этом устойчивость к H_2O_2 вегетативных клеток и спор зависит от штамма, поскольку некоторые штаммы *B. pumilus* были в 2-3 раза более устойчивы, чем стандартный штамм *B. subtilis* 168, используемый в качестве индикатора выживаемости экстремофилов в космическом пространстве и чистых комнатах. Но наибольшую устойчивость к УФ-излучению проявил штамм *B. pumilus* SAFR-032 (Newcombe et al., 2005). Споры штамма *B. pumilus* SAFR-032 были доставлены на МКС и подверглись воздействию космических условий (Vaishampayan et al., 2012). После 18 месяцев воздействия на споры штамма SAFR-032 условиями открытого космоса выжило 10-40% спор. Идентичные образцы спор *B. pumilus*

SAFR-032 исследовались и на Земле при моделируемых космических условиях. Оказалось, что споры, подвергнутые наземному «марсианскому» моделированию, показали меньшее снижение жизнеспособности по сравнению с «космическими марсианскими условиями, УФ-марс» и в «марсианских условиях» на Земле выживаемость спор достигала 85-100%. Интересно также, что споры, полученные из клеток, побывавших в космосе, показывали повышенную устойчивость к УФ-излучению по сравнению с исходными наземными контрольными вариантами спор *B. pumilus* SAFR-032. Установлено, что белки (супероксиддисмутаза), придающие устойчивость к УФ-облучению, присутствовали в более высокой концентрации в спорах, связанных с космосом, чем у контрольных земных (Vaishampayan et al., 2012). Важно еще раз отметить, что штаммы видов *B. pumilus* и *B. safensis*, обнаруженные нами на РС МКМ (Таблица 9) очень близки из-за их 99,5% сходства в последовательности их гена 16S рРНК и только полногеномное секвенирование может идентифицировать эти виды как отдельные. На МКС видовое разнообразие изученных там бацилл составляет не более двух десятков. Следовательно, в условиях МКС остаются жизнеспособными только те виды, которые могут переносить, прежде всего, длительное высушивание и недостаток питательных веществ. Кроме того, там могут преобладать и те виды, которые лучше выдерживают предполетную обработку материалов и оборудования с помощью УФ-облучения и жидких дезинфектантов.

Ранее на кафедре микробиологии МГУ с поверхности оборудования РС МКС были выделены и идентифицированы с помощью молекулярных методов *B. licheniformis* 7-12 (Alekhova et al., 2015). Этот штамм был выбран для проверки устойчивости его эндоспор к воздействию различных доз УФ-облучения. В качестве референтного штамма использовали *B. licheniformis* КМ МГУ 14 из музея кафедры микробиологии. Облученные эндоспоры обеих культур давали новые колонии на МПА + 0,5% глюкозы до 144 часов экспозиции на этой питательной среде (Таблицы 10, 11). Поэтому количество выживших эндоспор на чашках подсчитывали через 144 часа экспозиции на питательной среде, когда все эндоспоры успевали прорасти в колонии. Показано, что необлученные (контроль) эндоспоры «космического» штамма *B. licheniformis* 7-12 прорастают на питательной среде медленнее «земных» *B. licheniformis* КМ МГУ 14 (Таблицы 10, 11). Так через 24 часа экспозиции необлученных эндоспор (контроль) штамма *B. licheniformis* 7-12 прорастает около 30% этих эндоспор (Таблица 10). А через 24 часа экспозиции необлученных эндоспор (контроль) «земного» штамма *B. licheniformis* КМ МГУ 14 прорастает около 46% эндоспор (Таблица 11).

Таблица 10. Количество выросших колоний *B. licheniformis* 7-12 после воздействия разных доз УФ-облучения эндоспор (мин, Дж/м²) и разного времени экспозиции облученных эндоспор на среде МПА + 0,5% глюкозы (часы). Контроль – эндоспоры без облучения.

Время и доза УФ-облучения (мин, Дж/м ²)	Время экспозиции эндоспор после УФ-облучения, часы							% выживших эндоспор через 144 час их экспозиции по отношению к контролю
	18	24	48	72	96	120	144	
Контроль без облучения	9	22	51	66	73	73	73	
1 мин (96 Дж/м ²)	2	10	32	55	66	69	69	
2 мин (192 Дж/м ²)	-	3	28	46	61	65	65	
3 мин (288 Дж/м ²)	-	-	26	43	58	63	63	
4 мин (384 Дж/м ²)	-	-	24	41	54	55	55	
5 мин (480 Дж/м ²)	-	-	22	39	51	53	53	73
6 мин (576 Дж/м ²)	-	-	19	36	42	44	45	
7 мин (672 Дж/м ²)	-	-	18	34	39	42	42	
8 мин (768 Дж/м ²)	-	-	16	31	34	36	36	
9 мин (864 Дж/м ²)	-	-	13	27	30	31	31	
10 мин (960 Дж/м ²)	-	-	12	25	27	28	28	38
11 мин (1056 Дж/м ²)	-	-	10	20	22	24	24	
12 мин (1152 Дж/м ²)	-	-	8	16	17	18	18	
13 мин (1248 Дж/м ²)	-	-	7	8	12	13	15	
14 мин (1344 Дж/м ²)	-	-	6	7	11	12	12	
15 мин (1440 Дж/м ²)	-	-	5	6	8	8	8	11
16 мин (1536 Дж/м ²)	-	-	4	5	5	6	7	
17 мин (1632 Дж/м ²)	-	-	4	5	5	5	5	
18 мин (1728 Дж/м ²)	-	-	2	3	3	4	4	
19 мин (1824 Дж/м ²)	-	-	-	2	2	3	3	
20 мин (1920 Дж/м ²)	-	-	-	1	1	2	3	4
21 мин (2016 Дж/м ²)	-	-	-	-	1	2	2	
22 мин (2112 Дж/м ²)					-	2	2	
23 мин (2208 Дж/м ²)					-	-	-	
24 мин (2304 Дж/м ²)					-	-	-	
25 мин (2400 Дж/м ²)								

Таблица 11. Количество выросших колоний *B. licheniformis* КМ МГУ 14 после воздействия разных доз УФ-облучения эндоспор (мин, Дж/м²) и разного времени экспозиции чашек с облученными спорами на среде МПА + 0,5 % глюкозы (часы). Контроль – эндоспоры без УФ-облучения.

Время и доза УФ-облучения (мин, Дж/м ²)	Время экспозиции эндоспор после УФ-облучения, часы							% выживших эндоспор через 144 час их экспозиции по отношению к контролю
	18	24	48	72	96	120	144	
Контроль, количество колоний без облучения	14	33	54	62	70	71	71	
1 мин (96 Дж/м ²)	5	16	43	54	62	66	66	
2 мин (192 Дж/м ²)	-	9	33	45	54	58	58	
3 мин (288 Дж/м ²)	-	2	24	36	44	47	47	
4 мин (384 Дж/м ²)	-	-	20	28	33	37	37	
5 мин (480 Дж/м ²)	-	-	18	24	28	31	31	44
6 мин (576 Дж/м ²)	-	-	14	18	22	26	26	
7 мин (672 Дж/м ²)	-	-	10	15	19	22	22	
8 мин (768 Дж/м ²)	-	-	7	13	17	20	20	
9 мин (864 Дж/м ²)	-	-	5	10	13	15	16	
10 мин (960 Дж/м ²)	-	-	3	7	9	13	13	18,3
11 мин (1056 Дж/м ²)	-	-	-	3	5	8	8	
12 мин (1152 Дж/м ²)	-	-	-	-	2	3	3	
13 мин (1248 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	2	2	
14 мин (1344 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	1	1	0
15 мин (1440 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
16 мин (1536 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
17 мин (1632 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
18 мин (1728 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
19 мин (1824 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
20 мин (1920 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
21 мин (2016 Дж/м ²)	-	-	-	-	-	-	-	
22 мин (2112 Дж/м ²)								
23 мин (2208 Дж/м ²)								
24 мин (2304 Дж/м ²)								
25 мин (2400 Дж/м ²)								

Установлено также, что облученные эндоспоры *B. licheniformis* 7-12 выживали до дозы облучения 2112 Дж/м² (Таблица 10), а *B. licheniformis* КМ МГУ 14 – только до дозы

1344 Дж/м² (Таблица 11). На рисунке 20 отображено количество выросших колоний *B. licheniformis* 7-12 после воздействия разных доз УФ-облучения эндоспор от 1 мин (96 Дж/м²) до 22 мин (2112 Дж/м²) после экспозиции чашек с облученными спорами на среде МПА в течение 18, 24, 48, 72, 96, 120 и 144 часов. На рисунке 21 отображено количество выросших колоний *B. licheniformis* КМ МГУ 14 после воздействия разных доз УФ-облучения эндоспор от 1 мин (доза 96 Дж/м²) до 14 мин (доза 1344 Дж/м²) после экспозиции чашек с облученными спорами на среде МПА в течение 18, 24, 48, 72, 96, 120 и 144 часов. Количество выживших эндоспор (колоний на чашках) по отношению к необлученным (контроль) составляло после 10 мин УФ-облучения (960 Дж/м²) через 144 час экспозиции чашек с эндоспорами у *B. licheniformis* 7-12 38%, а у *B. licheniformis* КМ МГУ 14 – только 18,3% (Таблицы 10, 11). Таким образом, эндоспоры штамма *B. licheniformis* 7-12 оказались значительно более устойчивыми к УФ облучению, чем *B. licheniformis* КМ МГУ 14. Однако причины этого еще предстоит изучить.

Глава 7. Определение устойчивости штаммов бацилл, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, к антибиотикам

7.1. Определение устойчивости штаммов бацилл, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, к пенициллинам и цефалоспорином

В начале настоящей работы отсутствовали как список антибиотиков, рекомендуемых EUCAST для подавления роста бактерий рода *Bacillus*, так и критерии EUCAST для оценки действия антибиотиков на бациллы. Поэтому вначале нами был выбран для воздействия на бактерии рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и медицинской лаборатории, набор антибиотиков, подавляющих рост бацилл и включающий, согласно данным из литературы, такие β-лактамы, как пенициллин, ампициллин, меропенем, ряд производных цефалоспорином I-го (цефазолин), II-го (цефуросим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений, а также аминогликозид спектиномицин (Таблица 12). Спектиномицин не относится к β-лактамам антибиотикам, но используется в качестве резервного препарата в случаях невозможности лечения пациентов цефалоспорином третьего и четвертого поколений из-за аллергических реакций на эти антибиотики.

В этой части работы изучали резистентность *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, выделенные из образцов, доставленных с РС МКС и идентифицированные до вида с применением молекулярных методов, 4 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных и идентифицированных нами в настоящей работе из образцов, доставленных с РС МКС в 2018 г. и 5 штаммов, полученных из больничной лаборатории в 2019 г. Идентификацию проводили анализом генов 16S рРНК, методами масс-спектрометрии с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF MS и полногеномного секвенирования (Таблица 9). Для сравнительного изучения использованы также штаммы бактерий рода *Bacillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ: *B. licheniformis* КМ МГУ 14, *B. pumilus* КМ МГУ 364 и *B. subtilis* КМ МГУ 25 (Таблица 9).

7.1.1. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков у штаммов с РС МКС и больничной лаборатории

Резистентность штаммов бацилл пенициллинам и цефалоспорином исследовали определением МИК антибиотиков методом последовательных разведений с использованием 96-луночных планшетов. Показано, что все семь штаммов с РС МКС, устойчивы к пенициллину и ампициллину со значениями МИК 16-2048 мкг/мл, а также к цефалоспорином и меропенему с МИК от 2 до 2048 мкг/мл (Таблица 12).

Резистентность бактерий к аминогликозиду спектиномицину, применяемому у пациентов с аллергией на β -лактамы пенициллины и цефалоспорины, находилась в диапазоне МИК от 32 до 2048 мкг/мл. Штамм *B. licheniformis* 7-12 с РС МКС показал очень высокую устойчивость к пенициллину, ампициллину и цефтриаксону с МИК 1024 мкг/мл. Штамм *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 устойчив только к пенициллину, ампициллину и спектиномицину с МИК 128, 256 и 256 мкг/мл соответственно (Таблица 12).

Штамм *B. pumilus* 8-12 также показал высокую резистентность ко всем исследуемым антибиотикам, особенно к ампициллину и цефтазидиму с МИК 2048 мкг/мл и цефоперазону и цефепиму с МИК 1024 мкг/мл. Наиболее эффективными ингибиторами оказались цефуроксим и цефтриаксон с МИК 64 и 128 мкг/мл соответственно, а также меропенем с МИК 16 мкг/мл. (Таблица 12). Штамм *B. pumilus* КМ-МГУ 364, подобно *B. pumilus* 8-12, показал высокую устойчивость в отношении цефтазидима и цефепима с МИК 1024 и 512 мкг/мл соответственно, но по сравнению со штаммом 8-12, устойчивость штамма КМ МГУ 364 была ниже ко всем исследованным антибиотикам. Штамм *B. subtilis* 14-12 показал значительную устойчивость только к пенициллину, ампициллину, цефуроксиму и спектиномицину со значениями МИК 2048, 2048, 16 и 32 мкг/мл соответственно. *B. subtilis* КМ-МГУ 25 показал сходную с *B. subtilis* 14-12 картину резистентности, за исключением более высокой устойчивости к спектиномицину с МИК 2048 мкг/мл. (Таблица 12).

Таблица 12. МИК антибиотиков (мкг/мл) у бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории.

Штамм	Антибиотик									
	Пеницилин	Ампициллин	Цефазолин	Цефутоксим	Цефтриаксон	Цефоперазон	Цефтазидим	Цефепим	Меропенем	Спектиномицин
<i>B. amyloliquefaciens</i> PWN2D	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	1024	1024	2	2	2	2	2	2	-	64
<i>B. cereus</i> LR2HG21	512	2048	2	1024	16	16	512	64	1024	512
<i>B. cereus</i> HSA01	2048	2048	64	1024	128	128	512	512	-	256
<i>B. cereus</i> HSA12	2048	2048	128	1024	512	128	1024	1024	-	128
<i>B. cereus</i> HSA03	2048	2048	128	1024	256	128	256	1024	-	64
<i>B. licheniformis</i> 7-12	1024	1024	128	64	1024	512	128	128	16	512
<i>B. licheniformis</i> КМ МГУ 14	128	256	4	16	2	2	4	2	4	256
<i>B. pumilus</i> 8-12	256	2048	256	64	128	1024	2048	1024	16	256
<i>B. pumilus</i> КМ МГУ 364	16	64	32	8	64	32	1024	512	8	64
<i>B. safensis</i> НЕР3В2	1024	512	1024	128	1024	16	128	128	1024	256
<i>B. subtilis</i> 14-12	2048	2048	2	16	2	4	4	2	2	32
<i>B. subtilis</i> КМ МГУ 25	2048	2048	2	-	2	4	4	2	-	2048
<i>B. subtilis</i> DLA64	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>B. subtilis</i> HSA06	256	256	2	4	2	2	4	2	-	16

Примечание: Знак «-» означает, что МИК этих антибиотиков не определялась.

Из выделенных с РС МКС штаммов бацилл максимальные значения МИК для изученных антибиотиков обнаружил штамм *B. safensis* НЕР3В2, который был устойчив ко всем исследуемым антибиотикам, причем не только к пенициллину и ампициллину, но и к цефазолину, цефтриаксону, меропенему с МИК 1024 мкг/мл (Таблица 12). У штамма *B. cereus* LR2HG21 максимальная резистентность обнаружена к ампициллину с МИК 2048 мкг/мл, МИК для цефутоксима и меропенема составляли 1024 мкг/мл, а для пенициллина, спектиномицина и цефтазидима – по 512 мкг/мл (Таблица 12). Штаммы *B. amyloliquefaciens* PWN2D и *B. subtilis* DLA64 показали одинаковые значения МИК ко всем исследуемым антибиотикам. Оба штамма были устойчивы к пенициллину, ампициллину и спектиномицину с МИК 256 мкг/мл.

Три из выделенных из больничной лаборатории штаммов бактерий – *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03 показали высокую резистентность к пенициллину и ампициллину со значением МИК 2048 мкг/мл (Таблица 12). Устойчивость еще двух штаммов из больничной лаборатории – *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 к пенициллину и ампициллину оказалась ниже со значениями МИК 256 мкг/мл и

1024 мкг/мл, соответственно. Устойчивость *B. cereus* HSA01, HSA12, HSA03 к цефалоспорином оказалась ниже, чем к пенициллину и ампициллину, однако значения МИК были достаточно высокими и составляли от 64 до 1024 мкг/мл. В отличие от этого *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали устойчивость только к ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл, в то время как резистентность этих штаммов к цефалоспорином I-IV-го поколений была низкой со значениями МИК 24 мкг/мл. Все пять штаммов бацилл из больничной лаборатории – *B. cereus* HSA01, HSA12, HSA03, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали резистентность к спектиномицину в диапазоне МИК от 16 до 265 мкг/мл (Таблица 12).

7.1.2. Активность эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus* с РС МКС

Использование разобшителя СССР показало отсутствие активных эффлюкс-насосов у *B. licheniformis* 7-12 с высокими значениями МИК к пенициллину и ампициллину, что позволило предположить наличие у этого штамма механизма β -лактамазной защиты от этих антибиотиков (Таблица 13). Еще у трех штаммов, устойчивых к пенициллину и ампициллину – *B. subtilis* 14-12, *B. cereus* LR2HG21, *B. safensis* НЕР3В2, функционирует другой механизм защиты – активный транспорт антибиотика из клетки, опосредованный наличием эффлюкс-насосов, действующих за счет электрохимического потенциала клеточной мембраны. Показано, что у штаммов *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. cereus* LR2HG21, *B. safensis* НЕР3В2, *B. amyloliquefaciens* PWN2D, *B. subtilis* DLA64 резистентность к производным цефалоспорином III-IV-го поколений цефтриаксону, цефтазидиму, цефепиму и аминогликозиду спектиномицину также, очевидно, обеспечивается системами активного оттока ксенобиотиков, относящимися к группе второстепенных транспортеров (Таблица 13).

Второстепенные транспортеры включают семейства MFS, SMR, RND, MATE и функционируют за счет электрохимического потенциала мембраны. Одним из самых распространенных способов подавления эффлюкс-насосов, относящихся к второстепенным транспортерам, является применение разобшителя СССР, который мы применяли в исследованиях.

7.1.3. Активность эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus* из больничной лаборатории

Возможность функционирования эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus* из больничной лаборатории *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 определяли только для тех антибиотиков, к которым у бактерий была обнаружена высокая резистентность (Таблица 12).

Таблица 13. Значения МИК антибиотиков и активность эффлюкс-насосов у штаммов *Vaccillus*, выделенных с РС МКС, для пенициллина, ампициллина, цефалоспоринов и спектиномицина.

Микроорганизм	Антибиотик	МИК антибиотика (мкг/мл)	МИК в присутствии СССР (мкг/мл)	Кратность уменьшения МИК	Активность эффлюкса
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Пенициллин	1024	1024	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Ампициллин	1024	1024	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> КМ-МГУ 14	Пенициллин	128	128	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> КМ-МГУ 14	Ампициллин	256	256	1	Отсутствует
<i>B. subtilis</i> 14-12	Пенициллин	2048	16	128	Высокая
<i>B. subtilis</i> 14-12	Ампициллин	2048	16	128	Высокая
<i>B. cereus</i> LR2HG21	Пенициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>B. cereus</i> LR2HG21	Ампициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>B. safensis</i> НЕР3В2	Пенициллин	1024	2	512	Высокая
<i>B. safensis</i> НЕР3В2	Ампициллин	512	16	32	Высокая
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Цефтазидим	128	16	8	Умеренная
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Спектиномицин	512	32	16	Умеренная
<i>B. pumilus</i> 8-12	Цефтриаксон	128	6	8	Умеренная
<i>B. pumilus</i> 8-12	Цефепим	1024	64	16	Умеренная
<i>B. cereus</i> LR2HG21	Цефепим	64	16	4	Умеренная
<i>B. cereus</i> LR2HG21	Спектиномицин	512	32	16	Умеренная
<i>B. safensis</i> НЕР3В2	Цефепим	128	2	64	Высокая
<i>B. safensis</i> НЕР3В2	Спектиномицин	256	2	128	Высокая
<i>B. amyloliquefaciens</i> PWN2D	Спектиномицин	256	8	32	Высокая
<i>B. subtilis</i> DLA64	Спектиномицин	256	2	128	Высокая

Установлено, что у *B. cereus* HSA01 в присутствии пенициллина или ампициллина активность эффлюкса высокая, а у *B. cereus* HSA03 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 умеренная. В то же время у *B. cereus* HSA12 и *B. subtilis* HSA06 наличие эффлюкса в присутствии пенициллина или ампициллина не обнаружено (Таблица 14). Для изучения эффлюкса у *B. cereus* HSA01 были использованы также цефуроксим, цефтазидим, цефепим, к которым у штамма HSA01 обнаружена высокая резистентность и аминогликозид спектиномицин, как антибиотик, заведомо не подверженный действию β -лактамаз. Показана умеренная активность эффлюкс-насосов у *B. cereus* HSA01 только в отношении цефуроксима и полное отсутствие эффлюкса при наличии в среде других антибиотиков (Таблица 14).

У *B. cereus* HSA12 действие эффлюкса исследовали в отношении цефепима, цефтазидима, цефуроксима, цефтриаксона, цефазолина с высокими значениями МИК. Наличие умеренной активности эффлюкса обнаружено только в присутствии цефтазидима и цефуроксима (Таблица 14). Действие эффлюкса у *B. cereus* HSA03 изучали в вариантах с цефа-

золином, цефуроксимом, цефтазидимом и цефепимом со значениями их МИК 128, 1024, 256 и 1024 мкг/мл соответственно. Умеренная активность эффлюкс-насосов показана только в отношении цефепима и цефтазидима (Таблица 14).

7.1.4. Наличие β -лактамаз у штаммов *Bacillus* из больничной лаборатории

Различают сериновые β -лактамазы молекулярных классов С, А, D и металло- β -лактамазы (МБЛ) класса В (Bush, 2018). На рисунке 22 показан результат типичного опыта по выявлению МБЛ, относящихся к классу В, по образованию зоны подавления роста бактериального газона *B. cereus* HSA03 между диском, содержащим ЭДТА в центре чашки, и дисками, содержащими цефазолин и цефтазидим. У *B. cereus* HSA01 с помощью ЭДТА-теста показано наличие МБЛ-активности в отношении пенициллина и цефтазидима (Таблица 14). У *B. cereus* HSA12 тест выявил МБЛ, гидролизующие ампициллин, а также цефалоспорины III-го поколения цефтазидим и цефтриаксон. У *B. cereus* HSA03 активность МБЛ обнаружена в отношении ампициллина, цефазолина и цефтазидима. *B. subtilis* HSA06 отличается очень низкими значениями МИК в отношении всех исследуемых цефалоспоринов, но характеризуется достаточно высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 256 мкг/мл (Таблица 14). У штамма *B. subtilis* HSA06 ЭДТА-тест показал наличие МБЛ, гидролизующих оба этих антибиотика, в то время как активность эффлюкса у этого штамма в присутствии ампициллина и пенициллина отсутствует (Таблица 14). *B. amyloliquefaciens* HSA09, характеризующийся очень низкими значениями МИК в отношении исследуемых цефалоспоринов, но отличающийся высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл (Таблица 12), показал умеренную активность эффлюкса в отношении двух последних антибиотиков, однако активность МБЛ обнаружена только к ампициллину (Таблица 14).

Таким образом, у *B. cereus* HSA01 устойчивость к ампициллину и цефуроксиму обусловлена работой эффлюкс-насосов, к цефтазидиму обеспечивается действием металло- β -лактамаз (МБЛ), а к пенициллину объясняется работой обеих этих систем (Таблица 15).

Высокая устойчивость к ампициллину *B. cereus* HSA12 обеспечивается действием МБЛ, к цефуроксиму – активностью эффлюкса, в то время как резистентность к цефтазидиму сопровождается наличием МБЛ и действием эффлюкс-насосов. У *B. cereus* HSA03 резистентность к пенициллину, ампициллину, цефепиму и цефтазидиму объясняется активностью эффлюкса, к цефазолину и цефтазидиму обеспечивается действием МБЛ, а к ампициллину и цефтазидиму обусловлена наличием как МБЛ, так и эффлюкса. Устойчивость *B. subtilis* HSA06 к пенициллину и ампициллину обеспечивает только активность МБЛ. У *B. amyloliquefaciens* HSA09 устойчивость к ампициллину объясняется

как наличием МБЛ, так и действием эффлюкс-насосов, а к пенициллину обеспечивается только действием эффлюкса (Таблица 15).

Таблица 14. Значения МИК антибиотиков, активность эффлюкс-насосов и наличие β -лактамазу штаммов бацилл из больничной лаборатории для пенициллинов и цефалоспоринов.

Микроорганизм	Антибиотик	МИК мкг/мл	МИК мкг/мл + СССР	Кратность уменьшения	Активность эффлюкса	Металло- β - лактамазы (ЭДТА- тест)	Лактамазы NDM, VIM (класс B), KPC (класс A), OXA-48 (класс D)
<i>B. cereus</i> HSA01	Ампициллин	2048	64	32	Высокая	-	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA01	Пенициллин	2048	64	32	Высокая	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефепим	512	512	1	Отсутствует	-	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефтазидим	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA01	Спектиномицин	256	256	1	Отсутствует	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA12	Ампициллин	2048	2048	1	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA12	Пенициллин	2048	2048	1	Отсутствует	-	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефепим	1024	1024	1	Отсутствует	-	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	-	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтазидим	1024	128	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтриаксон	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA03	Ампициллин	2048	128	16	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Пенициллин	2048	128	16	Умеренная	-	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефепим	1024	128	8	Умеренная	-	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефтазидим	256	32	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефуроксим	1024	1024	1	Отсутствует	н/о	Не обнаружено
<i>B. subtilis</i> HSA06	Ампициллин	256	256	1	Отсутствует	+	
<i>B. subtilis</i> HSA06	Пенициллин	256	128	2	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Ампициллин	1024	256	4	Умеренная	+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Пенициллин	1024	128	8	Умеренная	-	Не обнаружено

Примечание: Знак «н/о» означает, что МБЛ для этих антибиотиков не определяли.

Таким образом, у группы бацилл из медицинской лаборатории резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринона обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, металло- β -лактамазы и/или эффлюкс-насосы (Таблица 15). Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

Таблица 15. Активность эффлюкса и наличие МБЛ в зависимости от штамма бактерий из медицинской лаборатории и антибиотика.

Штамм	Ампициллин	Пенициллин	Цефепим	Цефазолин	Цефтазидим	Цефтриаксон
<i>B. cereus</i> HSA03	-	+	-	-	+	-
<i>B. cereus</i> HSA12	+	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i> HSA01	+	-	-	-	+	+
<i>B. subtilis</i> HSA06	+	+	-	+	+	-
<i>B. subtilis</i> HSA09	+	-	н/о	н/о	н/о	н/о



- высокая активность эффлюкса + МБЛ



- умеренная активность эффлюкса + МБЛ



- обнаружены МБЛ

Кроме методики выявления активности МБЛ (класс В) с помощью ЭДТА-теста, применялась также методика RT-PCR определения как сериновых β -лактамаз, так и МБЛ типов KPC (класс А), NDM, VIM (класс В) и OXA-48 (класс D). Однако в группе исследуемых бактерий, выделенных из медицинской лаборатории, ни один из перечисленных типов β -лактамаз выявить не удалось (Таблица 14). Следовательно, у исследованной группы бактерий резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, металло- β -лактамазы и/или эффлюкс-насосы. Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

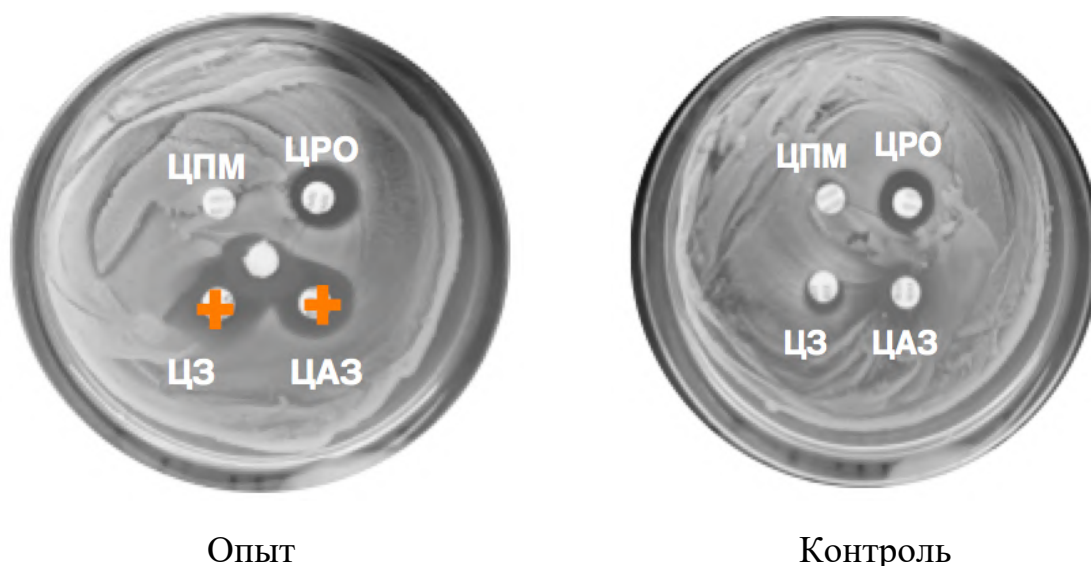


Рисунок 20. Определение наличия металло- β -лактамаз. Зона подавления роста *B. cereus* HSA03 возникла между дисками с ЭДТА, цефазолином (ЦЗ) и цефтазидимом (ЦАЗ).

Цефепим (ЦПМ);

Цефтриаксон (ЦРО);

Цефазолин (ЦЗ);

Цефтазидим (ЦАЗ).

7.2. Определение резистентности бацилл с РС МКС и больничной лаборатории к антибиотикам, рекомендованным EUCAST

7.2.1. Антибиотики, рекомендованные EUCAST

До 2020 года отсутствовал конкретный список антибиотиков в EUCAST, рекомендуемых для подавления роста бацилл. Однако в последних выпусках EUCAST (2021-2023) появился список из 9 антибиотиков для подавления роста штаммов бацилл, а также четкие критерии интерпретации оценки устойчивости бактерий *Bacillus spp.* к этим антибиотикам с помощью диско-диффузионного метода. Появление списка антибиотиков EUCAST свидетельствует о повышении в последние годы внимания научного и медицинского сообществ к заболеваниям, вызываемым штаммами разных видов бацилл. В список антибиотиков EUCAST включены 9 антибиотиков – имипенем, меропенем (β -лактамы), ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, (фторхинолоны), ванкомицин (гликопептиды), эритромицин (макролиды), клиндамицин (линкозамиды) и линезолид (оксазолидиноны). Поэтому диски, содержащие перечисленные антибиотики в концентрациях, рекомендованных EUCAST, были использованы в этой части работы.

7.2.2. Штаммы бацилл, исследованные на чувствительность к антибиотикам, рекомендованным EUCAST

В части работы по определению резистентности бацилл к антибиотикам, рекомендованным EUCAST, исследовали 23 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС, а также 5 видов – *B. cereus* HSA01, *B. cereu* HSA03, *B. cereus*HSA12, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09, полученных из больничной лаборатории (Таблица 16).

7.2.3. Определение чувствительности к антибиотикам, рекомендованным EUCAST

У бацилл, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, изучали устойчивость к действию антибиотиков, рекомендованным EUCAST, диско-диффузионным методом (Таблица 16). В последнем выпуске EUCAST (EUCAST, 2023) присутствуют критерии интерпретации для оценки устойчивости бактерий *Bacillus* sp. с помощью диско-диффузионного метода для таких антибиотиков, как имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид. Поэтому именно эти антибиотики были использованы в нашей работе. Показано, что у 11 штаммов бацилл из 28 изученных, обнаружена резистентность к эритромицину и 5 штаммов показали устойчивость к клиндамицину. При этом практически все шесть штаммов *B. paralicheniformis* с РС МКС оказались резистентными к эритромицину и клиндамицину. Штаммы *B. cereus* SE43, *B. cereus* LR2HG21, полученные с РС МКС, а также *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, выделенные из больничной лаборатории, показали устойчивость к фторхинолонам: ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину. Штаммы *B. cereus* SE42 проявил резистентность только к левофлоксацину. К линезолиду показали устойчивость три штамма из больничной лаборатории – *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12 (Таблица 16). У каждого из *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12, а также у *B. safensis* НЕР3В2, *B. safensis* SE192 и *B. subtilis* SE171 установлена резистентность к β -лактаму имипенему. К меропенему проявили устойчивость только *B. cereus* LR2HG21 и *B. subtilis* SE171 (Таблица 16).

Таблица 16. Резистентность к антибиотикам, рекомендованным EUCAST, у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории.

№	Штамм бактерий	Антибиотик								
		Имипенем	Меропенем	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Норфлоксацин	Ванкомицин	Эритромицин	Клиндамицин	Линезолид
1	<i>B. amyloliquefaciens</i> SE41									
2	<i>B. amyloliquefaciens</i> PWN2D									
3	<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09									
4	<i>B. cereus</i> SE42									
5	<i>B. cereus</i> SE43									
6	<i>B. cereus</i> LR2HG21									
7	<i>B. cereus</i> HSA01									
8	<i>B. cereus</i> HSA03									
9	<i>B. cereus</i> HSA12									
10	<i>B. paralicheniformis</i> SE71									
11	<i>B. paralicheniformis</i> SE131									
12	<i>B. paralicheniformis</i> SE161									
13	<i>B. paralicheniformis</i> SE181									
14	<i>B. paralicheniformis</i> SE182									
15	<i>B. paralicheniformis</i> SE183									
16	<i>B. pumilus</i> SE4									
17	<i>B. pumilus</i> SE191									
18	<i>B. safensis</i> HEP3B2									
19	<i>B. safensis</i> SE21									
20	<i>B. safensis</i> SE192									
21	<i>B. subtilis</i> SE12									
22	<i>B. subtilis</i> SE62									
23	<i>B. subtilis</i> SE15									
24	<i>B. subtilis</i> SE17									
25	<i>B. subtilis</i> SE171									
26	<i>B. subtilis</i> DLA64									
27	<i>B. subtilis</i> HSA06									
28	<i>Bacillus</i> sp. SE132									

Примечание: зеленое поле означает чувствительный штамм; красное поле – резистентный;

7.2.4. Полногеномное секвенирование и наличие генов резистентности

Осуществлено секвенирование полных геномов, прежде всего обнаруженных на РС МКС и в больничной лаборатории условных патогенов *B. cereus* LR2HG21, SE42, SE43, HSA01, HSA03, HSA12 и других штаммов, проявивших устойчивость к антибиотикам из списка EUCAST – имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину эритромицину и линезолиду, с целью определения наличия генов устойчивости к этим антибиотикам (Таблица 17).

Для анализа последовательностей бактериальной ДНК и определения генов устойчивости к антибиотикам (antimicrobial resistance genes, ARGs), мы использовали базу данных CARD. С целью обеспечения высокой точности идентификации ARGs в результаты исследований были включены только те гены, которые показали более 90% совпадения по идентичности последовательности и более 90% по длине последовательности с последовательностями, содержащимися в базе данных CARD. Этот подход позволил с высокой достоверностью идентифицировать гены, кодирующие резистентность к определенным антибиотикам. На рисунке 23 в качестве примера показаны гены ARGs *B. cereus* SE43 и *B. paralicheniformis* SE71 отвечающие этим критериям. На рисунке 24 показаны гены резистентности, обнаруженные у *B. cereus* LR2HG21 и *B. subtilis* SE171, у которых на диаграмме данных CARD зеленым цветом отмечены гены резистентности, показавшие «идеальное» совпадение данных секвенирования с базой данных CARD. «Идеальное» совпадения означает 100% идентичности и 100% длины последовательности гена бактерии с базой данных CARD (Рисунок 24).

На основе данных секвенирования штаммов, проявивших устойчивость к эритромицину и клиндамицину, с использованием базы CARD установлено наличие в геномах большинства этих штаммов бацилл кодируемого хромосомой гена *ermD*. Ген *ermD* обнаружен у *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183. Этот ген кодирует эритромицин-резистентную метилазу, обеспечивающую устойчивость к макролиду эритромицину и линкозамиду клиндамицину (Таблица 17). Механизмом устойчивости к этим антибиотикам является посттранскрипционная модификация рибосомальной РНК 23S путем моно/диметилирования остатка аденина. В результате нарушается комплементарность антибиотика к рибосоме и препарат не может ингибировать синтез белка. Все метилазы рРНК метилируют один и тот же остаток аденина, что приводит к фенотипу устойчивости к макролидам-линкозидам-стрептограмину В, при этом показано, что гены *erm* обеспечивают перекрестную резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* и преобладают у бактерий с высокой мультирезистентностью (Anjum et al., 2016; Jeong et al., 2020).

Таблица 17. Гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из РС МКС и больничной лаборатории, по результатам секвенирования с использованием базы данных CARD.

№	Штамм	Ген	Идентичность и длина (%)	Кодирует действие классов антибиотиков	Механизм действия антибиотика
1	<i>B. cereus</i> SE42	<i>clbA</i>	93 & 93	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	Изменение мишени
		<i>bcl-1</i>	91 & 100	Цефалоспорины, пенициллины	Инактивация
2	<i>B. cereus</i> SE43	<i>satA</i>	100 & 100	Нуклеозидные антибиотики	Инактивация
		<i>bcl-1</i>	91 & 98	Цефалоспорины, пенициллины	Инактивация
		<i>bla2</i>	98 & 100	Карбапенем, цефалоспорин, пенам	Инактивация
		<i>mphL</i>	90 & 98	Макролиды	Инактивация
		<i>fosB</i>	90 & 100	Фосфомицин	Инактивация
3	<i>B. cereus</i> LR2HG21	<i>TEM-116</i>	100 & 100	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация
		<i>BclI</i>	98 & 100	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
4	<i>B. cereus</i> HSA01	<i>TEM-116</i>	100 & 100	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация
		<i>FosBx1</i>	100 & 96	Антибиотики группы производных фосфоновой кислоты	Инактивация
		<i>BclI</i>	97 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
		<i>BclII</i>	91 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
5	<i>B. cereus</i> HSA03	<i>FosBx1</i>	100 & 100	Антибиотики группы производных фосфоновой кислоты	Инактивация
		<i>TEM-116</i>	100 & 100	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация
		<i>BclI</i>	97 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
		<i>BclII</i>	91 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
6	<i>B. cereus</i> HSA12	<i>TEM-116</i>	100 & 100	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация
7	<i>B. paralicheniformis</i> SE71	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А и В	Изменение мишени
		<i>bcrA</i>	99 & 96	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrB</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrC</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
8	<i>B. paralicheniformis</i> SE131	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А и В	Изменение мишени
		<i>bcrA</i>	99 & 96	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrB</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrC</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
9	<i>B. paralicheniformis</i> SE181	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А и В	Изменение мишени
		<i>bcrA</i>	99 & 96	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrB</i>	98 & 110	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrC</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени

10	<i>B. paralicheniformis</i> SE182	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А и В	Изменение мишени
		<i>bcrA</i>	99 & 96	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrB</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrC</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
11	<i>B. paralicheniformis</i> SE183	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А и В	Изменение мишени
		<i>bcrA</i>	99 & 96	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrB</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Эффлюкс
		<i>bcrC</i>	98 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
12	<i>B. safensis</i> SE192	<i>TEM-116</i>	100 & 100	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация
13	<i>B. subtilis</i> SE15	<i>ykkD</i>	100 & 100	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс
		<i>ykkC</i>	100 & 100	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс
		<i>Blt</i>	100 & 100	Фторхинолоны, дезинфицирующие средства и антисептики	Эффлюкс
		<i>B. subtilis mprF</i>	100 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
		<i>mphK</i>	100 & 100	Макролиды	Инактивация
		<i>tmrB</i>	100 & 100	Нуклеозиды	Снижение проницаемости
		<i>aadK</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация
		<i>vmlR</i>	100 & 100	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромугилин	Защита мишени действия
		<i>catA1</i>	100 & 100	Фениколовые антибиотики	Инактивация
<i>TEM-181</i>	100 & 100	Монобактам, цефалоспорин, пенам, пенем	Инактивация		
14	<i>B. subtilis</i> SE171	<i>ykkC</i>	100 & 100	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс
		<i>ykkD</i>	100 & 100	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс
		<i>Blt</i>	100 & 100	Фторхинолоны, дезинфицирующие средства и антисептики	Эффлюкс
		<i>aadK</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация
		<i>mphK</i>	100 & 100	Макролиды	Инактивация
		<i>tmrB</i>	100 & 100	Нуклеозиды	Снижение проницаемости
		<i>B. subtilis mprF</i>	100 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
		<i>vmlR</i>	100 & 100	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромугилин	Защита мишени действия
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация

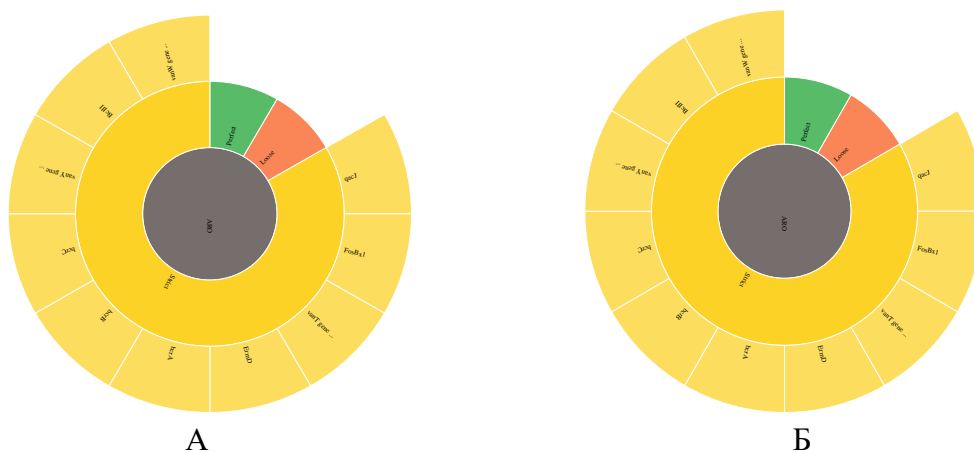


Рисунок 21. Гены резистентности, выявленные с помощью базы данных CARD по результатам полногеномного секвенирования штаммов *B. cereus* SE43 (А) и *B. paralicheniformis* SE71 (Б).

Зеленым цветом выделены гены, показавшие «идеальное» (100 & 100%) совпадение по идентичности и длине с эталонными последовательностями базы данных CARD; желтым цветом обозначены частичные совпадения (> 90 & 90%).

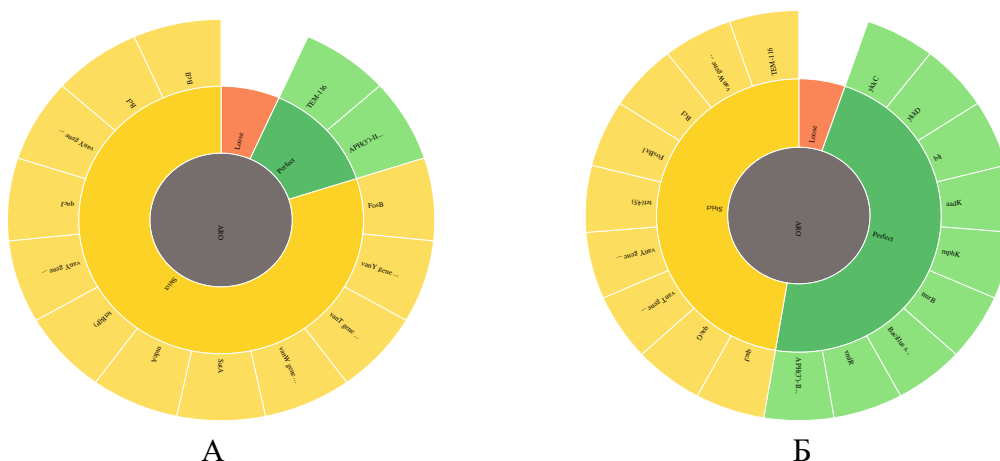


Рисунок 22. Гены резистентности, выявленные с помощью базы данных CARD, по результатам полногеномного секвенирования штаммов *B. cereus* LR2HG21 (А) и *B. subtilis* SE171 (Б). Отмечены желтым и зеленым цветом соответственно > 90 & 90% и 100 & 100% («идеальные») совпадения генов по идентичности и длине с последовательностями генов базы данных CARD.

А. *B. cereus* LR2HG21 – 2 «идеальных» совпадения генов устойчивости с базой CARD.

Б. *B. subtilis* SE171 – 9 «идеальных» совпадений генов устойчивости с базой CARD.

Полногеномное секвенирование и фенотипическое тестирование 104 штаммов *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* из различных источников показало, что у всех 30 штаммов *B. paralicheniformis*, и у 20 из 74 штаммов *B. licheniformis* обнаружен хромосомный ген *ermD*, кодирующий рРНК-аденин-N6-диметилазу, состоящую из 286-287 аминокислот

(Agersø et al., 2019). Следовательно, устойчивость к эритромицину у бацилл очень хорошо коррелирует с наличием гена *ermD*. Ген *erm D* обнаружен нами у штаммов *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 (Таблица 17). Показано, что классы генов *ermD* и *ermC* локализованы на хромосоме у *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и близкородственных видов *Bacillus*, резистентных к эритромицину и клиндамицину, при этом они не связаны с какими-либо мобильными генетическими элементами (Agersø et al., 2019; Jeong et al., 2020). У резистентного к эритромицину штамма *B. cereus* SE43 (Таблица 17), не имеющего генов *erm*, обнаружен хромосомный ген *mphL*, кодирующий макролидные фосфотрансферазы, инактивирующие 14-15-членные макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*. Ген *mphL* видимо был приобретен на ранней стадии эволюции группы *B. cereus* и является у этих бактерий геном внутренней резистентности, не связанным с плазмидными последовательностями (Wang et al., 2015). В результате секвенирования штаммов бацилл SE15, SE43, SE171, показавших устойчивость к эритромицину (Таблица 17), у двух из них – *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 обнаружен ген *mphK* (Таблица 17), кодирующий хромосомную макролид-фосфотрансферазу, инактивирующую макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis* (Wang et al., 2015).

На основе данных секвенирования с использованием базы данных CARD установлено наличие в геномах большинства штаммов, резистентных к имипенему – *B. cereus* LR2HG21, *B. safensis* SE192, *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, гена *TEM-116*, кодирующего устойчивость бактерий к β -лактамным антибиотикам (Таблица 17). Ген *TEM-116* кодирует β -лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС), обуславливающую резистентность к пенициллинам, цефалоспорином, имипенему путем их гидролиза (Bush, Bradford, 2020).

У *B. cereus* HSA01 и *B. cereus* HSA03, выделенных из больничной лаборатории и проявивших устойчивость к β -лактаму имипенему (Таблица 16), с помощью полногеномного секвенирования выявлено наличие генов *BcI* и *BcII* (Таблица 17). У штамма *B. cereus* LR2HG21, резистентного к имипенему и меропенему (Таблица 16), секвенирование показало наличие только гена *BcII* (Таблица 17). Ген *BcI* кодирует сериновую β -лактамазу I *B. cereus* класса А группы 2А, гидролизующую ряд пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов у ряда бацилл (Alcock et al., 2023). Ген *BcII* кодирует β -лактамазу II, которая представляет собой термостабильный маннан-связывающий лектин, расщепляющий пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы у *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* (Alcock et al., 2023).

К устойчивости к линезолиду у *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12 могли привести мутации в генах 23S рРНК и мутации в генах *rplC*, *rplD*, кодирующих рибосомальные белки (Pournaras et al., 2013). Полногеномное секвенирование *B. cereus* LR2HG21 обнаружило у этого штамма (Таблица 17) ген *APH(3')-IIa*, кодирующий аминокликозид-3'-О-фосфотрансферазы и объясняющий у *B. cereus* LR2HG21 устойчивость к аминокликозиду спектиномицину (Таблица 17). Следует отметить, что гены *TEM-116* и *APH(3')-IIa* у исследованных бактерий показали «идеальные» 100 % совпадения данных секвенирования с базой данных CARD по идентичности и длине последовательностей генов (Таблица 17).

Резистентность к фторхинолонам ципрофлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину обнаружена у четырех штаммов *B. cereus* – LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 (Таблица 17). Однако генов устойчивости к этим антибиотикам у перечисленных штаммов методом полногеномного секвенирования в базе данных CARD обнаружить не удалось. Видимо, основной механизм резистентности к фторхинолонам у этих штаммов бактерий связан с мутациями в генах *gyrA* и *parC*, кодирующих GyrA и ParC субъединицы ферментов (quinolone-resistance-determining region) ДНК-гиразы и топоизомеразы соответственно (Wilson et al., 2008). Еще один механизм резистентности бактерий к фторхинолонам связан с нарушением процесса проникновения антибиотика в клетку через пориновые каналы (Xia et al., 2010).

В таблицу 17 включены также гены резистентности, обнаруженные у исследованных видов бактерий с помощью базы CARD и кодирующие устойчивость к антибиотикам, не использовавшимся в данном исследовании. Это, например, гены устойчивости к бацитрацину *bcrA*, *bcrB*, *bcrC*, кодирующие АТФ-связывающие кассетные транспортеры (эффлюкс), обнаруженные у всех штаммов *B. paralicheniformis*. Переносчик Bcr ABC обеспечивает иммунитет к синтезирующему бацитрацин штамму *B. licheniformis* (Podlesek et al., 2000). Наличие генов *bcrA*, *bcrB*, *bcrC* подтверждает наличие у исследованных штаммов *B. paralicheniformis* множественной лекарственной устойчивости (Таблица 17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на поверхности оборудования ни в одной из точек контроля на РС МКС весной и осенью 2018 года на площади 100 см² не превышало норматива, установленного International Space Station Medical Operations Requirements Document (ISS MORD NASA) для поверхностей оборудования МКС в полетном режиме работы, который не должен превышать 10000 КОЕ/100 см². (Таблицы 3, 4, 5). Результаты исследований подтвердили имеющиеся данные о том, что виды бактерий рода *Bacillus* присутствуют на МКС как второй по частоте обнаружения

род (Quagliariello et al., 2022). И если преобладание стафилококков и микрококков на МКС можно объяснить их связью с человеком (Coil et al., 2016), то высокая встречаемость представителей рода *Bacillus* связана с их чрезвычайно высокой устойчивостью к высушиванию, недостатку питательных веществ, адгезией к любым поверхностям, включая нержавеющую сталь, способностью формировать биопленки (Chęcinska et al., 2015; Majed et al., 2016).

Осенью 2018 года бациллы были обнаружены на РС МКС в 23 пробах из 26 (Таблица 5). Число известных видов рода *Bacillus* уже превышает 260 (Christie, Setlow, 2020; Nikolaidis et al., 2022), однако идентификация штаммов, выделенных нами с РС МКС и медицинской лаборатории, позволила отнести их всего к семи видам – *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*. При этом из 34 штаммов бацилл, выделенных из поверхностей оборудования РС МКС и больницы лаборатории, 3 штамма из РС МКС идентифицированы как *B. cereus* LR2HG21, SE42, SE43, а 3 штамма из лаборатории – как *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12 (Таблица 9). Виды *B. pumilus* и *B. safensis*, а также *Bacillus licheniformis* и *Bacillus paralicheniformis* являются на РС МКС представителями близкородственных видов (Таблица 9).

Исторически *B. anthracis* был признан единственным патогенным видом рода, однако некоторые штаммы *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. alvei* и некоторых других видов были описаны как оппортунистические и даже патогенные (Farrar, Reboli, 2006; Schmid et al., 2021). *B. cereus*, является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. Он занимает третье место, после представителей *Salmonella* и *Staphylococcus aureus*, среди возбудителей инфекций, связанных с пищевыми отравлениями. Этот условно-патогенный вид способствует возникновению рвотных и диарейных синдромов у животных и людей. *B. cereus* синтезирует широкий спектр потенциальных факторов вирулентности, включая токсины и ферменты, разрушающие ткани (Zhang et al., 2019). При этом *B. cereus* формирует особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* и *B. anthracis* (Schmid et al., 2021). Исследования состояния здоровья космонавтов показывают, что в полете у них уменьшается костная и мышечная массы, снижается иммунитет, острота зрения, возникают стрессовые состояния (Afshinneko et al., 2020), нарушается состав микробиома (Voorhies et al., 2019). Известно, что некорректная антибиотикотерапия вызывает высокий уровень смертности у пациентов с бактериемией, вызванной *B. cereus* и многими другими видами бацилл, поэтому препараты для терапии должны применяться с учетом чувствительности к ним возбудителя (Bianco et al., 2021). При этом медобслуживание космонавтов зависит от наземной службы поддержки, они

лишены прямого клинического сопровождения, поэтому особенно уязвимы к заболеваниям. Однако, данных о клинических характеристиках штаммов *B. cereus* и других бацилл, вызывающих инфекции, а также их этиотропной терапии еще очень мало. В этой связи работа по выбору спектра клинически значимых антибиотиков, особенно рекомендуемых EUCAST, к которым бациллы проявляют высокую чувствительность, приобретает особую практическую значимость.

Изучение чувствительности выделенных из РС МКС и больничной лаборатории штаммов бацилл к 19 клинически значимым антибиотикам показало наличие устойчивости к 18 из них (Таблицы 12, 16). Эти изменения клинических свойств бактерий в космосе могут создать проблемы при выборе антибиотиков для лечения на борту МКС заболеваний, вызванных *B. cereus* и некоторыми другими видами бацилл.

«Космические» штаммы *B. licheniformis* 7-12 и *B. pumilus* 8-12 показали на порядок и более высокую устойчивость (МИК) к пенициллину, ампициллину, цефалоспорином, меропенему и спектиномицину, чем штаммы *B. licheniformis* КМ МГУ 14 и *B. pumilus* КМ МГУ 364, взятые для сравнительного анализа из коллекции кафедры микробиологии МГУ (Таблица 12). Штаммы *B. cereus* LR2HG21 и *B. safensis* НЕР3В2, выделенных с РС МКС, также проявили высокую устойчивость к пенициллину, ампициллину, цефалоспорином I-IV поколений, меропенему и спектиномицину (Таблица 12). В то же время все штаммы, взятые из коллекции МГУ – *B. licheniformis* КМ МГУ 14, *B. pumilus* КМ МГУ 364, *B. subtilis* КМ МГУ 25 и лишь два «космических» штаммы бацилл – *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* DLA64 показали очень низкую устойчивость к цефалоспорином поколений I-IV и меропенему (Таблица 12). И если низкую устойчивость коллекционных культур можно объяснить их многолетним хранением в коллекции, в результате чего устойчивость к антибиотикам у них не успела сформироваться, то причины и механизмы резистентности антибиотикам «космических» штаммов могут быть различными. Показано, что у бактерий рода *Bacillus* могут функционировать по крайней мере один или одновременно несколько механизмов защиты от антибиотиков, например, действие эффлюкса, β -лактамаз и модификация мишени (Таблицы 13, 14, 15, 17). Несколько механизмов могут функционировать одновременно, но вклад каждого из них зависит как от штамма бактерий, так и конкретного антибиотика. Кроме того, набор механизмов устойчивости к антибиотикам у штаммов бацилл может увеличиваться в результате горизонтального переноса генов, как это может быть в случае с геном *TEM-116*, кодирующим БЛРС (Berbers et al., 2020; Sultan et al., 2020) или генами *BcI* и *BcII*, обеспечивающими резистентность к имипенему и меропенему (Meini et al., 2015; Nolivos et al., 2019), которые могут находиться как в хромосоме, так и в плазмидах.

Однако, кроме перечисленных механизмов устойчивости к различным антибиотикам необходимо учитывать и мутации генов, которые часто являются основным механизмом резистентности к фторхинолонам, линезолиду и другим антибиотикам у грамположительных бактерий (Pournaras et al., 2013). Мутации (аминокислотные замены, делеции, инсерции) происходят в генах, кодирующих мишени действия антибиотиков, белки системы эффлюкса, пориновых каналов (Wang et al., 2015).

Устойчивость бактерий к противомикробным препаратам считается одной из главных проблем 21-го века (Nolte, 2014). Постоянное наблюдение за микробными сообществами таких асептических помещений, как РС МКС и больничная лаборатория, позволяет оценить факторы риска для здоровья людей, а в случае с МКС также обеспечить целостность станции и функционирование ее систем. Так Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства США (НАСА) определило, что исследование микробиома МКС является основной целью текущих и будущих исследований на орбите Земли (Mora et al., 2016).

ВЫВОДЫ

1. Методами анализа гена 16S рРНК, MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлена принадлежность 31 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и медицинской лаборатории, всего к семи видам – *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*.
2. Изучение чувствительности выделенных с РС МКС и больничной лаборатории штаммов бацилл к 19 клинически значимым антибиотикам показало наличие устойчивости к 18 из них. Впервые определена резистентность бацилл, выделенных с РС МКС, к 9 антибиотикам, рекомендованным EUCAST – имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, линезолиду.
3. У некоторых штаммов бацилл, выделенных с РС МКС и медицинской лаборатории, в том числе условно-патогенных *B. cereus* LR2HG21, *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, показано наличие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – резистентности к нескольким структурно и функционально не родственными антибиотикам, таким как β -лактамы, фторхинолоны, оксазолидиноны, аминогликозиды.
4. Отсутствие активных эффлюкс-насосов у *B. licheniformis* 7-12 с высокими значениями МИК к пенициллину и ампициллину, свидетельствует о наличии у этого штамма только механизма β -лактамазной защиты от этих антибиотиков. У всех других штаммов с РС МКС устойчивых к пенициллину, ампициллину, производным цефалоспоринов и спектиномицину, резистентность обеспечивается также эффлюкс-насосами, функционирующими за счет электрохимического потенциала клеточной мембраны.
5. Резистентность *B. cereus* LR2HG21 к пенициллину, ампициллину, имипенему, меропенему, цефуроксиму, цефтриаксону, цефоперазону, цефтазидиму, цефепиму, спектиномицину обеспечивают система эффлюкса, гены *TEM-116* и *BcII*, кодирующие соответственно β -лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС) и β -лактамазу II, а устойчивость к спектиномицину обеспечивает также ген *APH(3')-IIa*, кодирующий аминогликозид-3'-О-фосфотрансферазы.
6. Устойчивость к имипенему и меропенему *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 и *B. safensis* SE192 обеспечивает ген *TEM-116*. У *B. cereus* LR2HG21 устойчивость к имипенему и меропенему кодирует также ген *BcII*, а у *B. cereus* HSA01 и *B. cereus* HSA03 резистентность к имипенему обеспечивают гены *BcI* и/или *BcII*, кодирующие соответственно сериновую β -лактамазу I и β -лактамазу II.

7. Резистентность к эритромицину и/или клиндамицину *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 обеспечивает ген *ermD*, кодирующий эритромицин резистентную метилазу. У *B. cereus* SE43 устойчивость к эритромицину обеспечивает ген *mphL*, кодирующий макролидные фосфотрансферазы (Mphs), инактивирующие макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин. Резистентность *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 к эритромицину обеспечивает ген *mphK*, кодирующий макролид-фосфотрансферазу.
8. Обнаружение на РС МКС штаммов бацилл, обладающих высокой устойчивостью к клинически значимым антибиотикам, а также возможность расширения количества резистентных штаммов в результате горизонтального переноса генов, как это может быть в случае с генами *TEM-116*, *BcI* и *BcII*, требует постоянного мониторинга микробиоты МКС с целью предупреждения потенциальных рисков для здоровья космонавтов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- PBPs – пенициллинсвязывающие белки;
- MRSA – метициллинустойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*;
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация (антибиотика, антимикотика);
- МБЛ– металло-β-лактамаза;
- EUCAST– European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Европейский комитет по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам;
- CLSI–The Clinical and Laboratory Standards Institute, институт клинических и лабораторных стандартов;
- NASA –The National Aeronautics and Space Administration. Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства;
- ESA– European Space Agency. Европейское космическое агентство.
- ISS MORD – International Space Station Medical Operations Requirements Document;
- BSI –blood stream infections, инфекции системы кровообращения;
- NHEJ– non-homologous endjoining, негомологичное соединение концов при репарации ДНК;
- HAIS– superbugs and hospital-acquired infections, внутрибольничные инфекции, вызванные супербактериями;
- ВБИ – внутрибольничные инфекции (госпитальные, нозокомиальные);
- МРО – мультирезистентный организм, организм, устойчивый ко многим антибиотикам;
- BRHM– bacteria with reduced or halted metabolism, бактерии со сниженным или остановленным метаболизмом;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А., Митрикас В.Г., Цетлин В.В. Радиационная обстановка на ОК "Мир" на фазе минимума 22-го цикла солнечной активности (1994-1996 гг.) //Авиакосмическая биология и экологическая медицина, 2000. Т.34. №.1. С. 21-24.
2. Герхардт Ф. Методы общей микробиологии // Под ред. Ф. Герхардта. М. «Мир». – 1983. Т. 1-3.
3. ГОСТ 30494-2011 Здания, жилые и общественные. Параметры микроклимата в помещениях. 2012.
4. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Том 1. / М.: «ГЭОТАР-Медиа». 2019. 448 С.
5. Карпов, Д.С., Осипова, П.Д., Домашин, А.И., Поляков, Н., Соловьев, А.Ю., Зубашева, М., Жуховицкий, В., Карпов, В.Л., Поддубко, С.В., Новикова, Н.Д. Сверхустойчивость штамма *Bacillus licheniformis* 24 к окислительному стрессу ассоциирована со сверхэкспрессией генов ферментативной антиоксидантной системы // Молекулярная биология. – 2020. Т. 54, № 5, С. 858-871
6. Новикова Н.Д. Основные закономерности формирования среды обитания орбитального комплекса МИР// Авиакосмическая и экологическая медицина, 2001. Т. 35. №4. С. 32-40.
7. Поддубко С.В. Обоснование путей и способов защиты оборудования орбитальных станций от микробиологических повреждений / Автореф. дисс. канд. биол. наук. М. 2007. 23 С.
8. Adams R.I., Miletto M., Taylor J.W., Bruns T.D. Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances // ISME Journal. – 2013. – V. 7. – №. 7. – P. 1262–1273.
9. Agersø Y., Bjerre K., Brockmann E., Johansen E., Nielsen B., Siezen R., Stuer-Lauridsen B., Wels M., Zeidan A.A. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome // PLoS One. – 2019. – V. 14. – №. 1. – P. e0210363.
10. Ahmed M., Lyass L., Markham P.N., Taylor S.S., Vázquez-Laslop N., Neyfakh A.A. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated // Journal of Bacteriology. – 1995. – V. 177. – №. 14. – P. 3904-3910.
11. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., Smith K.W., Raphenya A.R., Wlodarski M.A., Edalatmand A., Petkau A., Syed S.A., Tsang K.K., Baker S.J.C., Dave M., McCarthy M.C., Mukiri K.M., Nasir J.A., Golbon B., Imtiaz H., Jiang X., Kaur K., Kwong M., Liang Z.C., Niu K.C., Shan P., Yang J.Y.J., Gray K.L., Hoad G.R., Jia B., Bhandu T., Carfrae L.A., Farha M.A., French S., Gordzevich R., Rachwalski K., Tu M.M., Bordeleau E., Dooley D., Griffiths E., Zubyk H.L., Brown E.D., Maguire F., Beiko R.G., Hsiao W.W.L., Brinkman F.S.L., Van Domselaar G., McArthur A.G.

- CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database // *Nucleic acids research*. – 2023. – V. 51. D690-D699.
12. Alekshun M.N, Levy S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance // *Cell*. – 2007. – V. 128. – №. 6. – P. 1037–1050.
 13. Alrazeeni D., Alsufi M. Nosocomial infections in ambulances and effectiveness of ambulance fumigation techniques in Saudi Arabia // *Saudi Medical Journal*. – 2014. – V. 35. – №. 11. – P. 1354–1360.
 14. Amend A.S., Seifert K.A., Samson R., Bruns T.D. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107. – №. 31. – P. 13748–13753.
 15. Aminov R.I., Mackie R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – V. 271. – №. 2. – P. 147–161.
 16. Anjum R., Krakat N. Detection of multiple resistances, biofilm formation and conjugative transfer of *Bacillus cereus* from contaminated soils // *Current microbiology*. – 2016. – V. 72. – №. 3. – P. 321-328.
 17. Arentshorst M., Ram A.F., Meyer V. Using non-homologous end-joining-deficient strains for functional gene analyses in filamentous fungi // *Methods in Molecular Biology*. – 2012. – V. 835. – P. 133-150.
 18. Arthur M., Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1993. – V. 37. – №. 8. – P. 1563–1571.
 19. Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells // *Journal of Bacteriology*. – 2018. – V. 200. – №. 24. – P. e00249-18.
 20. Baker P.W., Meyer M.L., Leff L.G. *Escherichia coli* growth under modeled reduced gravity // *Microgravity Science and Technology*. – 2004. – V. 15. – P. 39-44.
 21. Bakkeren E., Diard M., Hardt W.D. Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – V. 18. – №. 9. – P. 479-490.
 22. Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – V. 17. – №. 7. – P. 441–448.
 23. Baran A., Kwiatkowska A., Potocki L. Antibiotics and bacterial resistance — a short story of an endless arms race // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – №. 6. – P. 5777.

24. Baranova N., Elkins C.A. Antimicrobial drug efflux pumps in other gram-positive bacteria // Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, regulation and clinical implications / Eds. X. Li, C.A. Elkins, H.I. Zgurskaya. Switzerland: Springer Intern. Publ. – 2016. – P. 197–218.
25. Baranova N.N., Danchin A., Neyfakh A.A. Mta, a global MerR-type regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug-efflux transporters // Molecular Microbiology. – 1999. – V. 31. – №. 5. – P. 1549–1559.
26. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J.P., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria* // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2015. – V. 80. – №. 1. – P. 1–43.
27. Barlow M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer // Methods in Molecular Biology. – 2009. – №. 532. – P. 397-411.
28. Becker K., Heilmann C., Peters G. Review: Coagulase-negative Staphylococci // Clinical Microbiology Reviews. – 2014. – V. 27. – №. 4. – P. 870-926.
29. Beladjal L., Gheysens T., Clegg J.S., Amar M., Mertens J. Life from the ashes: survival of dry bacterial spores after very high temperature exposure // Extremophiles. – 2018. – V. 22. – №. 5. – P. 751-759.
30. Benoit M., Klaus D.M. Microgravity, bacteria, and the influence of motility // Advances in Space Research. – 2007. – V. 39. – P. 1225-1232.
31. Benoit M.R., Li W., Stodieck L.S., Lam K.S., Winther C.L., Roane T.M., Klaus D.M. Microbial antibiotic production aboard the International Space Station // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 70. – №. 4. – P. 403-411.
32. Benveniste R., Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1973. – V. 70. – №. 8. – P. 2276-2280.
33. Bianco A., Capozzi L., Monno M. R., Del Sambro L., Manzulli V., Pesole G., Loconsole D., Parisi A. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing // Frontiers in microbiology. – 2021. – V. 11. – P. 599524.
34. Biswas S., Raoult D., Rolain J. M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis // International journal of antimicrobial agents. – 2008. – V. 32. – №. 3. – P. 207-220.
35. Biswas S., Raoult D., Rolain J.M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2008. – V. 32. – №. 3. – P. 207–220.

36. Blachowicz A., Chiang A.J., Elsaesser A., Kalkum M., Ehrenfreund P., Stajich J.E., Torok T., Wang C.C.C., Venkateswaran K. Proteomic and metabolomic characteristics of extremophilic fungi under simulated Mars conditions // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 1013.
37. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – V. 13. – №. 1. – P. 42–51.
38. Blanco P., Hernando-Amado S., Reales-Calderon J.A., Corona F., Lira F., Alcalde-Rico M., Bernardini A., Sanchez M.B., Martinez J.L. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants // *Microorganisms*. – 2016. – V. 4. – №. 1. P – 1-14.
39. Boguraev A.S., Christensen H.C., Bonneau A.R., Pezza J.A., Nichols N.M., Giraldez A.J., Gray M.M., Wagner B.M., Aken J.T., Foley K.D., Copeland D.S., Kraves S., Alvarez Saavedra E. Successful amplification of DNA aboard the International Space Station // *NPJ Microgravity*. – 2017. – V. 3. – P. 26.
40. Bokulich N.A., Mills D.A., Underwood M.A. Surface microbes in the neonatal intensive care unit: changes with routine cleaning and over time // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – V. 51. – №. 8. – P. 2617–2624.
41. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E. Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel // *Nutrition*. – 2002. – V. 18. – P. 889–898.
42. Brolund A., Sandegren L. Characterization of ESBL disseminating plasmids // *Infect Dis (Lond)*. – 2016. – V. 48. – №. 1. – P. 18–25.
43. Brooks B., Firek B.A., Miller C.S., Sharon I., Thomas B.C., Baker R., Morowitz M.J., Banfield J.F. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants // *Microbiome*. – 2014. – V. 2. – P. 1.
44. Brown R., Minnon J., Schneider S., Vaughn J. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ambulances in southern Maine // *Prehospital Emergency Care*. – 2010. – V. 14. – №. 2. – P. 176-181.
45. Bryce E.A., Walker M., Scharf S., Lim A.T., Walsh A., Sharp N., Smith J.A. An outbreak of cutaneous aspergillosis in a tertiary-care hospital // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 1996. – V. 17. – №. 3. – P. 170-172.
46. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. In *Bacillus subtilis*, the SatA (Formerly YyaR) acetyltransferase detoxifies streptothricin via lysine Acetylation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2017. – V. 83. – №. 21. – P. e01590-17.
47. Burton A.S., Stahl S.E., John K.K., Jain M., Juul S., Turner D.J., Harrington E.D., Stoddart D., Paten B., Akeson M., Castro-Wallace S.L. Off earth identification of bacterial populations using 16S rDNA nanopore sequencing // *Genes*. – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 76.

48. Bush K (ed). Antibiotics and antibiotic resistance. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
49. Bush K. Classification for β -lactamases: historical perspectives // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2023. – V. 21. – №. 5. – P. 513-522.
50. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2018. – V. 62. – №. 10: e01076-18.
51. Bush K., Bradford P.A. Epidemiology of β -Lactamase-producing pathogens // Clinical Microbiology Reviews. – 2020. – V. 33. – №. 2. – P. e00047-19.
52. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – V. 54. – №. 3. – P. 969–976.
53. Cadet J., Anselmino C., Douki T., Voituriez L. Photochemistry of nucleic acids in cells // The Journal of Photochemistry and Photobiology B. – 1992. – V. 15. – №. 4. – P. 277-298.
54. Cao M., Helmann J.D. Regulation of the *Bacillus subtilis* *bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors // Journal of Bacteriology. – 2002. – V. 184. – №. 22. – P. 6123–6129.
55. Cassir N., Rolain J.M., Brouqui P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics // Frontiers in Microbiology. – 2014. – V. 20. – №. 5. – P. 551.
56. Castro S.L., Smith D.J., Ott C.M. A Researcher's Guide to International Space Station: Microbial Research / NASA ISS Program Science Office (2013).
57. Castro V.A., Thrasher A.N., Healy M., Ott C.M., Pierson D.L. Microbial characterization during the early habitation of the International Space Station // Microb Ecol. – 2004. – V. 47. – №. 2. – P. 119-126.
58. Castro-Wallace S.L., Chiu C.Y., John K.K., Stahl S.E., Rubins K.H., McIntyre A.B.R., Dworkin J.P., Lupisella M.L., Smith D.J., Botkin D.J., Stephenson T.A., Juul S., Turner D.J., Izquierdo F., Federman S., Stryke D., Somasekar S., Alexander N., Yu G., Mason C.E., Burton A.S. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 1: 18022.
59. Chalker, A.F., Ingraham K. A., Lunsford R. D., Bryant A. P., Bryant J., Wallis N. G., Broskey J. P., Pearson S. C., Holmes D. J. The *bacA* gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence // Microbiology. – 2000. – V. 146. – P. 1547–1553.
60. Chan C.Y., Kiechle M., Manivasakam P., Schiestl R.H. Ionizing radiation and restriction enzymes induce microhomology-mediated illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35. – P. 5051-5059.

61. Chebotar' I.V., Emelyanova M.A., Bocharova J.A., Mayansky N.A., Kopantseva E.E., Mikhailovich V.M. The classification of bacterial survival strategies in the presence of antimicrobials // *Microb Pathog.* – 2021. – V. 155. – P. 104901.
62. Checinska A., Probst A.J., Vaishampayan P., White J.R., Kumar D., Stepanov V.G., Fox G.E., Nilsson H.R., Pierson D.L., Perry J., Venkateswaran K. Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities // *Microbiome.* – 2015. – V. 3. – №. 1. – P. 50-68.
63. Checinska Sielaff A., Urbaniak C., Mohan G.B.M., Stepanov V.G., Tran Q., Wood J.M., Minich J., McDonald D., Mayer T., Knight R., Karouia F., Fox G.E., Venkateswaran K. Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces // *Microbiome.* 2019. V. 7. N 1. P. 50.
64. Chen Y., Succi J., Tenover F.C., Koehler T.M. Beta-lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain // *Journal of Bacteriology.* – 2003. – V. 185. - №. 3. – P. 823-830.
65. Christie G., Setlow P. *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn // *Cellular signalling.* – 2020. – V. 74. – P. 109729.
66. Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance // *Cell Host Microbe.* – 2013. – V. 12. – №. 6. – P. 632–642.
67. Coil D.A., Neches R.Y., Lang J.M., Brown W.E., Severance M., Cavalier D.D., Eisen J.A. Growth of 48 built environment bacterial isolates on board the International Space Station (ISS) // *Peer J.* – 2016. – V. 4. – №. 3. – P. 1842.
68. Colombo A.L., Melo A.S., Crespo Rosas R.F., Salomão R., Briones M., Hollis R.J., Messer S.A., Pfaller M.A. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* – 2003. – V. 46. – №. 4. – P. 253-257.
69. Coughlin J.M., Rudolf J.D., Wendt-Pienkowski E., Wang L., Unsin C., Galm U., Yang D., Tao M., Shen B. BlmB and TlmB provide resistance to the bleomycin family of antitumor antibiotics by N-acetylating metal-free bleomycin, tallysomylin, phleomycin, and zorbamylin // *Biochemistry.* – 2014. – V. 53. – №. 41. – P. 6901-6909.
70. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci // *Clinical Infectious Diseases.* – 2006. – V. 42. – №. 1. – P. 25–34.
71. Cox G., Wright G.D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2013. – V. 303. – №. 6-7. – P. 287–292.
72. Crabbé A., Nielsen-Preiss S.M., Woolley C.M., Barrila J., Buchanan K., McCracken J., Inglis D.O., Searles S.C., Nelman-Gonzalez M.A., Ott C.M., Wilson J.W., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper

- H.M., Hyman L.E., Nickerson C.A. Spaceflight enhances cell aggregation and random budding in *Candida albicans* // PLoS One. – 2013. – V. 8. – №. 12: e80677.
73. Crowe-McAuliffe C., Graf M., Huter P., Takada H., Abdelshahid M., Nováček J., Murina V., Atkinson G.C., Hauryliuk V., Wilson D.N. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – №. 36. – P. 8978–8983.
74. Crucian B., Sams C. Immune system dysregulation during spaceflight: clinical risk for exploration-class missions // Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – V. 86. – №. 5. – P. 1017–1018.
75. D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient // Nature. – 2011. – V. 477. – №. 7365. – P. 457–461.
76. D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. Sampling the antibiotic resistome // Science. – 2006. – V. 311. – №. 5759. – P. 374–377.
77. Dai X., Wang H., Ju L-K., Cheng G., Cong H., BMZ N. Corrosion of aluminum alloy 2024 caused by *Aspergillus niger* // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2016. – V. 115. – P. 1–10.
78. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes // Science. – 1994. – V. 264. – №. 5157. – P. 375–382.
79. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2010. – V. 74. – №. 3. – P. 417–433.
80. Davies R.B., Abraham E.P. Metal cofactor requirements of beta-lactamase II // The Biochemical journal. – 1974. – V. 143 – №. 1. – P. 129-135.
81. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. The Firmicutes. New York: Springer; 2009. 3: 1450 pp.
82. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – V. 1794. – №. 5. – P. 808–816.
83. Douthwaite S., Crain P.F., Liu M., Poehlsgaard J. The tylosin-resistance methyltransferase RlmA(II) (TlrB) modifies the N-1 position of 23S rRNA nucleotide G748 // Journal of Molecular Biology. – 2004. – V. 337. – №. 5. – P. 1073-1077.
84. Durand C., Maubon D., Cornet M., Wang Y., Aldebert D., Garnaud C. Can We Improve Antifungal Susceptibility Testing? // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. – V. 11: 720609.

85. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential // *Microbiology spectrum*. – 2019. – V. 7. – №. 3. :10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
86. Eirakaiby M.T., Gamal-Eldin S., Amin M.A., Aziz R.K. Hospital microbiome variations as analyzed by high-throughput sequencing // *OMICS*. – 2019. – V. 23. – №. 9. – P. 426-438.
87. Evers S., Quintiliani R. Jr, Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in enterococci // *Microbial Drug Resistance*. – 1996. – V. 2. – №. 2. – P. 219-223.
88. Farrar W.E., Reboli A.C. The genus *Bacillus* – Medical // *The Prokaryotes. Handbook on the biology of bacteria*, vol. 4. *Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria* / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. P. 609-630.
89. Fisher J.F., Mobashery S. β -lactam resistance mechanisms: gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis* // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – V. 6: a025221.
90. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells // *Nature Reviews Microbiology*. – 2017. – V. 15. – №. 8. – P. 453–464.
91. Fishovitz J., Hermoso J.A., Chang M., Mobashery S. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *IUBMB Life*. – 2014. – V. 66. – №. 8. – P. 572–577.
92. Fleeman R.M., Debevec G., Antonen K., Adams J.L., Santos R.G., Welmaker G.S., Houghten R.A., Giulianotti M.A., Shaw L.N. Identification of a novel polyamine scaffold with potent efflux pump inhibition activity toward multi-drug resistant bacterial pathogens // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 14. – №. 9. – P. 1301.
93. Foster T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2017. – V. 41. – №. 3. – P. 430–449.
94. Freedberg D.E., Salmasian H., Cohen B., Abrams J.A., Larson E.L. Receipt of antibiotics in hospitalized patients and risk for clostridium difficile infection in subsequent patients who occupy the same bed // *JAMA Internal Medicine*. – 2016. – V. 176. – №. 12. – P. 1801-1808.
95. Fyfe C., Grossman T.H., Kerstein K., Sutcliffe J. Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – V. 6. – №. 10: a025395.
96. Gauzere C., Godon J.J., Blanquart H., Ferreira S., Moularat S., Robine E., Moletta-Denat M. 'Core species' in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air // *Science of the Total Environment*. – 2014. – P. 485-486. – P. 508–517.
97. Glance L.G., Stone P.W., Mukamel D.B., Dick A.W. Increases in mortality, length of stay, and cost associated with hospital-acquired infections in trauma patients // *Archives of Surgery*. – 2011. – V. 146. – №. 7. – P. 794-801.

98. Golkar T., Zieliński M., Berghuis A.M. Look and outlook on enzyme-mediated macrolide resistance // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1942.
99. Guéguinou N., Huin-Schohn C., Bascove M., Bueb J. L., Tschirhart E., Legrand-Frossi C., Fripiat J. P. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – V. 86. – №. 5. – P. 1027-1038.
100. Guilfoile P.G, Hutchinson C.R. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – V. 88. – №. 19. – P. 8553-8557.
101. Hartman B.J., Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* // *Journal of Bacteriology*. – 1984. – V. 158. – №. 2. – P. 513–516.
102. Hassan K.A., Fagerlund A., Elbourne L.D.H., Vörös A., Kroeger J.K., Simm R., Tourasse N.J., Finke S., Henderson P.J.F., Økstad O.A., Paulsen I.T., Kolstø A.B. The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – №. 5. – P. :e0176188.
103. Henderson P.J.F., Maher C., Elbourne L.D.H., Eijkelkamp B.A., Paulsen I.T., Hassan K.A. Physiological functions of bacterial “multidrug” efflux pumps // *Chemical Reviews*. – 2021. V. 121. – P. 5417–5478.
104. Hewitt K.M., Gerba C.P., Maxwell S.L., Kelley S.T. Office space bacterial abundance and diversity in three metropolitan areas // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №. 5: e37849.
105. Hoffman-Roberts H.L., Babcock E.C., Mitropoulos I.F. Investigational new drugs for the treatment of resistant pneumococcal infections // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2005. – V. 14. – №. 8. – P. 973–995.
106. Hooper D.C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones // *Clinical Infectious Diseases*. – 2000. – V. 31. – №. 2. – P. 24–28.
107. Horneck G., Klaus D.M., Mancinelli R.L. Space microbiology // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2010. – V. 74. – №. 1. – P. 121-156.
108. Horneck G., Moeller R., Cadet J., Douki T., Rocco L., Mancinelli R.L., Wayne L., Nicholson W.L., Panitz C., Rabbow E., Rettberg P., Spry A., Stackebrandt E., Vaishampayan P., Venkateswaran K.J. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes - Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // *Astrobiology*. – 2012. – V. 12. – №. 5. – P. 445–456.
109. Hu Y., Gao G.F., Zhu B. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings // *Frontiers in Medicine*. – 2017. – V. 11. – №. 2. – P. 161–168.
110. Huang B., Li D.G., Huang Y., Liu C.T. Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism // *Military Medical Research*. – 2018. – V. 5. – P. 18.

111. Huovinen P., Huovinen S., Jacoby G.A. Sequence of PSE-2 beta-lactamase // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1988. – V. 32. – №. 1. – P. 134–136.
112. Ichijo T., Hieda H., Ishihara R., Yamaguchi N., Nasu M. Bacterial monitoring with adhesive sheet in the international space station-«Kibo», the Japanese experiment module // *Microbes and Environments*. – 2013. – V. 28. – №. 2. – P. 264-268.
113. Ichijo T., Shimazu T., Nasu M. Microbial monitoring in the international space station and its application on Earth // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2020. – V. 43. – №. 2. – P. 254-257.
114. Ichijo T., Yamaguchi N., Tanigaki F., Shirakawa M., Nasu M. Four-year bacterial monitoring in the International Space Station-Japanese experiment module "Kibo" with culture-independent approach // *NPJ Microgravity*. – 2016. – V. 2: 16007.
115. Jack D.L., Storms M.L., Tchieu J.H., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologous SMR-type proteins // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – V. 182. – №. 8. – P. 2311-2313.
116. Jedrzejewski M.J., Huang W.J. *Bacillus* species proteins involved in spore formation and degradation: from identification in the genome, to sequence analysis, and determination of function and structure // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 38. – №. 3. – P. 173–198.
117. Jeong D.W., Lee B., Heo S., Oh Y., Heo G., Le J.H. Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis // *PLoS One*. – 2020. – V. 15. – №. 4. :e0231274.
118. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J-P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – V. 12. – P. 181–196.
119. Kämper J., Esser K., Gunge N., Meinhardt F. Heterologous gene expression on the linear DNA killer plasmid from *Kluyveromyces lactis* // *Current Genetics*. – 1991. – V. 19. – №. 2. – P. 109–118.
120. Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormancy in non-sporulating bacteria // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1993. – V. 10. – №. 3–4. – P. 271–285.
121. Karsisiotis A.I., Damblon C.F., Roberts G.C.K. Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo-β-lactamase BcII and its complex with the broad-spectrum inhibitor R-thiomandelic acid // *Biochemical Journal*. – 2013. – V. 456. – №. 3. – P. 397–407.
122. Kashuba E., Dmitriev A.A., Kamal S.M., Melefors O., Griva G., Römling U., Ernberg I., Kashuba V., Brouchkov A. Ancient permafrost staphylococci carry antibiotic resistance genes // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 2017. – V. 28. – №. 1: 1345574.

123. Kester J.C., Fortune S.M. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2014. – V. 49. – №. 2. – P. 91–101.
124. Kim W., Tengra F.K., Young Z., Shong J., Marchand N., Chan H.K., Pangule R.C., Parra M., Dordick J.S., Plawsky J.L., Collins C.H. Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS One*. – 2013. – V. 8: e62437.
125. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C. One ring to rule them all: Current trends in combating bacterial resistance to the β -lactams // *Protein Science*. – 2016. – V. 25. – №. 4. – P. 787–803.
126. Knox B.P., Blachowicz A., Palmer J.M., Romsdahl J., Huttenlocher A., Wang C.C.C., Keller N.P., Venkateswaran K. Characterization of *Aspergillus fumigatus* isolates from air and surfaces of the International Space Station // *mSphere*. – 2016. – V. 1. – №. 5. – P. 1–15.
127. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – V. 8. – №. 6. – P. 423–435.
128. Kumano M., Fujita M., Nakamura K., Murata M., Ohki R., Yamane K. Lincomycin resistance mutations in two regions immediately downstream of the -10 region of *lmr* promoter cause overexpression of a putative multidrug efflux pump in *Bacillus subtilis* mutants // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – V. 47. – №. 1. – P. 432–435.
129. La Duc M.T., Kern R., Venkateswaran K. Microbial monitoring of spacecraft and associated environments // *Microbial ecology*. – 2004. – V. 47. – №. 2. – P. 150–158.
130. Lam K.S., Gustavson D.R., Pirnik D.L., Pack E., Bulanlagui C., Mamber S.W., Forenza S., Stodieck L.S., Klaus D.M. The effect of space flight on the production of actinomycin D by *Streptomyces plicatus* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 29. – №. 6. – P. 299–302.
131. Lawal A., Kirtley M.L., van Lier C.J., Erova T.E., Kozlova E.V., Sha J., Chopra A.K., Rosenzweig J.A. The effects of modeled microgravity on growth kinetics, antibiotic susceptibility, cold growth, and the virulence potential of a *Yersinia pestis* *ymoA*-deficient mutant and its isogenic parental strain // *Astrobiology*. – 2013. – V. 13. – №. 9. – P. 821–832.
132. Lax S., Sangwan N., Smith D., Larsen P., Handley K.M., Richardson M., Guyton K., Krezalek M., Shogan B.D., Defazio J., Flemming I., Shakhsher B., Weber S., Landon E., Garcia-Houchins S., Siegel J., Alverdy J., Knight R., Stephens B., Gilbert J.A. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital // *Science Translational Medicine*. – 2017. – V. 9. – №. 391: eaah6500.
133. Lax S., Smith D.P., Hampton-Marcell J., Owens S.M., Handley K.M., Scott N.M., Gibbons S.M., Larsen P., Shogan B.D., Weiss S., Metcalf J.L., Ursell L.K., Vázquez-Baeza Y., Van Treuren W., Hasan N.A., Gibson M.K., Colwell R., Dantas G., Knight R., Gilbert J.A. Longitudinal analysis of

- microbial interaction between humans and the indoor environment // *Science*. – 2014. – V. 345. – №. 6200. – P. 1048-1052.
- 134.Li H., Luo Y.F., Williams B.J., Blackwell T.S., Xie C.M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – V. 302. – №. 2. – P. 63–68.
- 135.Li X. Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update // *Drugs*. – 2009. – V. 69. – №. 12. – P. 1555-1623.
- 136.Lim H.M., Pène J.J., Shaw R.W. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene // *Journal of Bacteriology*. – 1988. – V. 170. – №. 6. :2873-2878.
- 137.Liras P., Martin J.F. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? // *International Microbiology*. – 2006. – Vol. 9. – P. 9–19.
- 138.Liu H., Prajapati V., Prajapati S., Bais H., Lu J. Comparative genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* focusing on phylogenomics, functional traits, and prevalence of antimicrobial and virulence genes // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – V. 12. – P. 724217.
- 139.Liu J., Chen D., Peters B.M, Li L., Li B., Xu Z., Shirliff M.E. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Microbial Pathogenesis*. – 2016. – V. 101. – P. 56–67.
- 140.Mak S., Xu Y., Nodwell J.R. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria // *Molecular Microbiology*. – 2014. – V. 93. – №. 3. – P. 391–402.
- 141.Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors // *Biochimie*. – 2005. – V. 87. – №. 12. – P. 1137-1147.
- 142.Marshall C.G., Lessard I.A., Park I., Wright G.D. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998. – V. 42. – №. 9. – P. 2215–2220.
- 143.Martinez J.L. Ecology and evolution of chromosomal gene transfer between environmental microorganisms and pathogens // *Microbiology Spectrum*. – 2018. – V. 6. – P. 1–16.
- 144.Mathers A. Mobilization of carbapenemase-mediated resistance in Enterobacteriaceae // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – V. 4. – №. 3.
- 145.McIntyre A.B.R., Rizzardi L., Yu A.M., Alexander N., Rosen G.L., Botkin D.J., Stahl S.E., John K.K., Castro-Wallace S.L., McGrath K., Burton A.S., Feinberg A.P., Mason C.E. Nanopore sequencing in microgravity // *NPJ Microgravity*. – 2016. – V. 2. – P. 16035.

146. Meadow J.F., Altrichter A.E., Kembel S.W., Moriyama M., O'Connor T.K., Womack A.M., Brown G.Z., Green J.L., Bohannon B.J.M. Bacterial communities on classroom surfaces vary with human contact // *Microbiome*. – 2014. – V. 2. – P. 7.
147. Medeiros A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics // *Clinical Infectious Diseases*. – 1997. – V. 24. – №. 1. – P. 19-45.
148. Medeot D., Sannazzaro A., Estrella M.J., Torres Tejerizo G., Contreras-Moreira B., Pistorio M., Jofré E. Unraveling the genome of *Bacillus velezensis* MEP₂₁₈, a strain producing fengycin homologs with broad antibacterial activity: comprehensive comparative genome analysis // *Scientific Reports*. – 2023. – V. 13. – №. 1. – P. 22168.
149. Mermel L.A. Infection prevention and control during prolonged human space travel // *Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – V. 56. – №. 1. – P. 123–130.
150. Michiels J.E., Van den Bergh B., Verstraeten N., Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence // *Drug Resistance Updates*. – 2016. – V. 29. – P. 76–89.
151. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2014. – V. 12. – №. 10. – P. 1221–1236.
152. Miyamoto T., Sukimoto K., Sayed M.A., Kim S.I., Honjoh K., Hatano S. Detection of penicillin-binding proteins in *Bacillus cereus* by using biotinylated β -lactams // *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. – 2000. – V. 44. – №. 3. – P. 299–307.
153. Mody L., Washer L.L., Kaye K.S., Gibson K., Saint S., Reyes K., Cassone M., Mantey J., Cao J., Altamimi S., Perri M., Sax H., Chopra V., Zervos M. Multidrug-resistant organisms in hospitals: what is on patient hands and in their rooms? // *Clinical Infectious Diseases*. – 2019. – V. 69. – №. 11. – P. 1837-1844.
154. Moissl-Eichinger C., Cockell C., Rettberg, P. Venturing into new realms? Microorganisms in space // *FEMS microbiology reviews*. – 2016. – V. 40. – №. 5. – P. 722-737.
155. Moore-Machacek A., Gloe A., O'Leary N., Reen F.J. Efflux, signaling and warfare in a polymicrobial world // *Antibiotics*. – 2023. V. 8. – №. 12. – P. 731.
156. Mora M., Mahnert A., Koskinen K., Pausan M.R., Oberauner-Wappis L., Krause R., Perras A.K., Gorkiewicz G., Berg G., Moissl-Eichinger C. Microorganisms in confined habitats: microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the international space station // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – №. 1573. – P. 1-20.
157. Mora M., Perras A., Alekhova T.A., Wink L., Krause R., Aleksandrova A., Novozhilova T., Moissl-Eichinger C. Resilient microorganisms in dust samples of the International Space Station-survival of the adaptation specialists // *Microbiome*. – 2016. – V. 4. – №. 1. – P. 65-85.
158. Mora M., Wink L., Kogler I., Mahnert A., Rettberg P., Schwendner P., Demets R., Cockell C., Alekhova T., Klingl A., Krause R., Zolotariof A., Alexandrova A., Moissl-Eichinger C. Space

- Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health // Nature Communications. – 2019. – V. 10. – №. 1: 3990.
159. Mukhtar T.A., Koteva K.P., Hughes D.W., Wright G.D. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – №. 30. – P. 8877–8886.
160. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance // Microbiology Spectrum. – 2016. – V. 4. – №. 2. – P. 10.
161. Murray B.E., Mederski-Samaroj B. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis* // Journal of Clinical Investigation. – 1983. – V. 72. – №. 3. – P. 1168–1171.
162. Murray I.A., Gil J.A., Hopwood D.A., Shaw W.V. Nucleotide sequence of the chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimycini* // Gene. – 1989. – V. 85. – №. 2. – P. 283–291.
163. Naidoo Y., Valverde A., Cason E.D., Pierneef R.E., Cowan D.A. A clinically important, plasmid-borne antibiotic resistance gene (β -lactamase TEM-116) present in desert soils // Science of the Total Environment. – 2020. – V. 719. – P. 137497.
164. National Research Council (U.S.). Committee for the Decadal Survey on Biological and Physical Sciences in Space. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
165. Nazarov P.A. MDR pumps as crossroads of resistance: antibiotics and bacteriophages // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – №. 6. – P. 734.
166. Newcombe D.A., Schuerger A.C., Benardini J.N., Dickinson D., Tanner R., Venkateswaran K. Survival of spacecraft-associated microorganisms under simulated martian UV irradiation // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – №. 12. – P. 8147–8156.
167. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 593–656.
168. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // Annual Review of Biochemistry. – 2009. – V. 78. – P. 119–146.
169. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2001. – V. 12. – №. 3. – P. 215–223.
170. Nikaido H., Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – V. 1794. – №. 5. – P. 769–781.
171. Nikolaidis M., Hesketh A., Mossialos D., Iliopoulos I., Oliver S.G., Amoutzias G.D. A comparative analysis of the core proteomes within and among the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* evolutionary groups reveals the patterns of lineage- and species-specific adaptations // Microorganisms. – 2022. – V. 10. – №. 9. – P. 1720.

172. Noh H., Shin S.D., Kim N.J., Ro Y.S., Oh H.S., Joo S.I., Kim J.I., Ong M.E. Risk stratification-based surveillance of bacterial contamination in metropolitan ambulances // *The Journal of Korean Medical Science*. – 2011. – V. 26. – №. 1. – P. 124-130.
173. Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer // *Science*. – 2019. – V. 364. – №. 6442. – P. 778–782.
174. Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I., Mergeay M. Survey of environmental biocontamination on board the international space station // *Research in Microbiology*. – 2006. – V. 157. – P. 5-12.
175. O'Hara N.B., Reed H.J., Afshinnekoo E., Harvin D., Caplan N., Rosen G., Frye B., Woloszynek S., Ounit R., Levy S., Butler E., Mason C.E. Metagenomic characterization of ambulances across the USA // *Microbiome*. – 2017. – V. 5. – №. 1. – P. 125.
176. Obana N., Takada H., Crowe-McAuliffe C., Iwamoto M., Egorov A.A., Wu K.J.Y., Chiba S., Murina V., Paternoga H., Tresco B.I.C., Nomura N., Myers A.G., Atkinson G.C., Wilson D.N., Haurlyuk V. Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – V. 51. – №. 9. – P. 4536–4554.
177. Obenza P., Cruz M., Buttner D., Woodard. Microbial contamination on ambulance surfaces: a systematic literature review // *Journal of Hospital Infection*. – 2022. – V. 122. – P. 44-59.
178. Ogawara H. Penicillin-binding proteins in *Actinobacteria* // *Journal of Antibiotics*. – 2015. – V. 68. – №. 4. – P. 223–245.
179. Ogawara H. Self-resistance in *Streptomyces*, with special reference to β -Lactam antibiotics // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – №. 5. – P. 605.
180. Paterson D.L., Bonomo R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2005. – V. 18. – №. 4. – P. 657-686.
181. Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems // *Microbiology Reviews*. – 1996. – V. 60. – №. 4. – P. 575–608.
182. Pawlowski A. C., Stogios P. J., Koteva K., Skarina T., Evdokimova E., Savchenko A., Wright, G. D. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes // *Nature communications*. – 2018. – V. 9. – №. 1. – P. 112.
183. Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G., Wright, G. D. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium // *Nature Communications*. – 2016. – V. 7. – P. 13803.

184. Peterson E., Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – №. 2829. – P. 1-29.
185. Peterson R.M., Huang T., Rudolf J.D., Smanski M.J., Shen B. Mechanisms of self-resistance in the platensimycin- and platencin-producing *Streptomyces platensis* MA7327 and MA7339 strains // *Chemical biology*. – 2014. – V. 21. – №. 3. – P. 389–397.
186. Poehlsgaard J., Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – V. 3. – №. 11. – P. 870-881.
187. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – V. 44. – №. 10. – P. 2595 – 2599.
188. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon // *Pathogens and Global Health*. – 2015. – V. 109. – №. 7. – P. 309–318.
189. Prudhomme M., Attaiech L., Sanchez G., Martin B., Claverys J.P. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* // *Science*. – 2006. – V. 313. – №. 5783. – P. 89–92.
190. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes // *Drug Resistance Updates*. – 2010. – V. 13. – №. 6. – P. 151–171.
191. Rappé M.S., Giovannoni S.J. The uncultured microbial majority // *Annual Review of Microbiology*. – 2003. – V. 57. – P. 369–394.
192. Reading C., Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1977. – V. 11. – №. 5. – P. 852–857.
193. Richter S.S., Doern G.V., Heilmann K.P., Miner S., Tendolkar S., Riahi F., Diekema D.J. Detection and prevalence of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013 // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – V. 54. – №. 3. – P. 812–814.
194. Roberts M.C., Soge O.O., No D., Beck N.K., Meschke J.S. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fire stations in two northwest fire districts // *American Journal of Infection Control*. – 2011. – V. 39. – №. 5. – P. 382-389.
195. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – V. 43. – №. 12. – P. 2823–2830.
196. Rosenzweig J.A., Abogunde O., Thomas K., Lawal A., Nguyen Y.U., Sodipe A., Jejelowo O. Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 85. – №. 4. – P. 885-891.

197. Roux S., Brum J.R., Dutilh B.E., Sunagawa S., Duhaime M.B., Loy A., Poulos B.T., Solonenko N., Lara E., Poulain J., Pesant S., Kandels-Lewis S., Dimier C., Picheral M., Searson S., Cruaud C., Alberti A., Duarte C.M., Gasol J.M., Vaqué D., Tara Oceans Coordinators, Bork P., Acinas S.G., Wincker P., Sullivan M.B. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses // *Nature*. – 2016. – V. 537. – №. 7622. – P. 689-693.
198. Saggese A., Giglio R., D'Anzi N., Baccigalupi L., Ricca E. Comparative genomics and physiological characterization of two aerobic spore formers isolated from human ileal samples // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. - №. 23. – P. 14946.
199. Saino Y., Kobayashi F., Inoue M., Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1982. – V. 22. – №. 4. – P. 564–570.
200. Sánchez-Hidalgo M., Núñez L.E., Méndez C., Salas J.A. Involvement of the beta subunit of RNA polymerase in resistance to streptolydigin and streptovaricin in the producer organisms *Streptomyces lydicus* and *Streptomyces spectabilis* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – №. 5. – P. 1684–1692.
201. Santomartino R., Waajen A.C., de Wit W., Nicholson N., Parmitano L., Loudon C.M., Moeller R., Rettberg P., Fuchs F.M., Van Houdt R., Finster K., Coninx I., Krause J., Koehler A., Caplin N., Zuijderduijn L., Zolesi V., Balsamo M., Mariani A., Pellari S.S., Carubia F., Luciani G., Leys N., Doswald-Winkler J., Herová M., Wadsworth J., Everroad R.C., Rattenbacher B., Demets R., Cockell C.S. No effect of microgravity and simulated Mars gravity on final bacterial cell concentrations on the international space station: applications to space bioproduction // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11: 579156.
202. Schindler B.D., Kaatz G.W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria // *Drug Resistance Updates*. – 2016. – №. 27. – P. 1-13.
203. Schmid P.J., Maitz S., Kittinger C. *Bacillus cereus* in packaging material: molecular and phenotypic diversity revealed // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 698974.
204. Schuerger A.C., Richards J.T., Newcombe D.A., Venkateswaran K. Rapid inactivation of seven *Bacillus* spp. under simulated Mars UV irradiation // *Icarus*. – 2006. – V. 181. – №. 1. – P. 52-62.
205. Schwarz S., Cloeckaert A., Roberts M. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup FM, editor. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* // ASM Press. – 2006. – P. 73–98.
206. Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – V. 28. – №. 5. – P. 519-542.

207. Schwarz S., Loeffler A., Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine // *Veterinary Dermatology*. – 2017. – V. 28. – №. 1: 82-e19.
208. Senatore G., Mastroleo F., Leys N., Mauriello G. Effect of microgravity & space radiation on microbes // *Future Microbiology*. – 2018. – V. 13. – P. 831-847.
209. Song Z., Wang X., Zhou X., Jiang S., Li Y., Ahmad O., Qi L., Li P. Li J. Taxonomic distribution of FosB in human-microbiota and activity comparison of fosfomycin resistance // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 200.
210. Stachyra T., Péchereau M.C., Bruneau J.M., Claudon M., Frère J.M., Miossec C., Coleman K., Black M.T. Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – №. 12. – P. 5132–5138.
211. Staley J.T., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // *Annual Review of Microbiology*. – 1985. – V. 39. – P. 321–346.
212. Stewart N.K., Bhattacharya M., Toth M., Smith C.A., Vakulenko S.B. A surface loop modulates activity of the *Bacillus* class D β -lactamases // *Journal of Structural Biology*. – 2020. – V. 211: 107544.
213. Stogios P.J., Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance // *Protein Science*. – 2020. – V. 29. – №. 3. – P. 654-669.
214. Sugantino M., Roderick S.L. Crystal structure of Vat(D): an acetyltransferase that inactivates streptogramin group A antibiotics // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – №. 7. – P. 2209–2216.
215. Sugiura, W., Yoda, T., Matsuba, T., Tanaka, Y., Suzuki, Y. Expression and characterization of the genes encoding azoreductases from *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus* // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2006. – V. 70. – №. 7. – P. 1655-1665.
216. Sultan I., Ali A., Gogry F. A., Rather I. A., Sabir J. S. M., Haq Q. M. R. (2020). Bacterial isolates harboring antibiotics and heavy-metal resistance genes co-existing with mobile genetic elements in natural aquatic water bodies // *Saudi journal of biological sciences*. – 2020. – V. 27. – №. 10. – P. 2660-2668.
217. Surette M.D., Wright G.D. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome // *Annual Review of Microbiology*. – 2017. – V. 71. – P. 309–329.
218. Takada M., Ito T., Kurashima M., Matsunaga N., Demizu Y., Misawa T. Structure-activity relationship studies of substitutions of cationic amino acid residues on antimicrobial peptides // *Antibiotics*. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 19.
219. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.

- 220.Thirsk R., Kuipers A., Mukai C., Williams D. The space-flight environment: the International Space Station and beyond // CMAJ. – 2009. – V. 180. – №. 12. – P. 1216–1220.
- 221.Thompson M.K., Keithly M.E., Harp J., Cook P.D., Jagessar K.L., Sulikowski G.A., Armstrong R.N. Structural and chemical aspects of resistance to the antibiotic fosfomycin conferred by FosB from *Bacillus cereus* // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – №. 41. – P. 7350–7362.
- 222.Timmery S., Hu X., Mahillon J. Characterization of Bacilli isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the International Space Station // Astrobiology. – 2011. – V. 11. – №. 4. – P. 323-334.
- 223.Torkar K.G., Bedenić B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates // Microbial Pathogenesis. – 2018. – V. 118. – P. 140-145.
- 224.Tóth A.G., Csabai I., Judge M.F., Maróti G., Becsei Á., Spisák S., Solymosi N. Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics // Antibiotics (Basel). – 2021. – V. 10. - №. 11. – P. 1287.
- 225.Uchino Y., Iriyama N., Matsumoto K., Hirabayashi Y., Miura K., Kurita D., Kobayashi Y., Yagi M., Kodaira H., Hojo A., Kobayashi S., Hatta Y., Takeuchi J. A case series of *Bacillus cereus* septicemia in patients with hematological disease // Internal medicine. – 2012. – V. 51. – №. 19. – P. 2733-2738.
- 226.Vaishampayan K.P., Cisneros J., Pierson D.L., Rogers S.O., Perry J. International Space Station environmental microbiome-microbial inventories of ISS filter debris // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 98. – №. 14. – P. 6453-6466.
- 227.Van Mulders S.E., Stassen C., Daenen L., Devreese B., Siewers V., van Eijsden R.G., Nielsen J., Delvaux F.R., Willaert R. The influence of microgravity on invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* // Astrobiology. – 2011. – V. 11. – №. 1. – P. 45-55.
- 228.Varona-Barquin A., Ballesteros-Peña S., Lorrío-Palomino S., Ezpeleta G., Zamanillo V., Eraso E., Quindós G. Detection and characterization of surface microbial contamination in emergency ambulances // American Journal of Infection Control. – 2017. – V. 45. – №. 1. – P. 69-71.
- 229.Venkateswaran K., Vaishampayan P., Cisneros J., Pierson D.L., Rogers S.O., Perry J. International Space Station environmental microbiome-microbial inventories of ISS filter debris // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 98. – P. 6453–6466.
- 230.Vico L., Collet P., Guignandon A., Lafage-Proust M.H., Thomas T., Rehaillia M., Alexandre C. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts // Lancet. – 2000. – V. 355. – №. 9215. – P. 1607–1611.
- 231.Voorhies A.A., Mark Ott C., Mehta S., Pierson D.L., Crucian B.E., Feiveson A., Oubre C.M., Torralba K., Moncera K., Zhang Y., Zurek E., Lorenzi H.A. Study of the impact of long-duration

- space missions at the International Space Station on the astronaut microbiome // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9: 9911.
232. Walker M.S., Walker J.B. Streptomycin biosynthesis and metabolism. Enzymatic phosphorylation of dihydrostreptobiosamine moieties of dihydro-streptomycin-(streptidino) phosphate and dihydrostreptomycin by *Streptomyces* extracts // *Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – V. 245. – №. 24. – P. 6683-6689.
233. Wang C., Sui Z., Leclercq S. O., Zhang G., Zhao M., Chen W., Feng J. Functional characterization and phylogenetic analysis of acquired and intrinsic macrolide phosphotransferases in the *Bacillus cereus* group // *Environmental microbiology*. – 2015. – V. 17. – №. 5. – P. 1560-1573.
234. Wilkins D., Leung M.H.Y., Lee P.K. Indoor air bacterial communities in Hong Kong households assemble independently of occupant skin microbiomes // *Environmental Microbiology*. – 2016. – V. 18. – №. 6. – P. 1754–1763.
235. Willdigg J.R., Patel Y., Arquilevich B.E., Subramanian C., Frank M.W., Rock C.O., Helmann J.D. The *Bacillus subtilis* cell envelope stress-inducible ytpAB operon modulates membrane properties and contributes to bacitracin resistance // *Journal of Bacteriology*. – 2024. – V. 206. – №. 3. – P. e0001524.
236. Wilson J.W., Ott C.M., Ramamurthy R., Porwollik S., McClelland M., Pierson D.L., Nickerson C.A. Low-Shear modeled microgravity alters the *Salmonella enterica* serovar typhimurium stress response in an RpoS-independent manner // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – №. 11. – P. 5408-5416.
237. Woegerbauer M., Kuffner M., Domingues S., Nielsen K.M. Involvement of *aph(3')-IIa* in the formation of mosaic aminoglycoside resistance genes in natural environments // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 19. – №. 6. – P. 442.
238. Xin L., Xu X., Shi Q., Han R., Wang J., Guo Y., Hu F. High prevalence and overexpression of fosfomycin-resistant gene *fosx* in *Enterococcus faecium* from China // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 900185.
239. Yamaguchi N., Roberts M., Castro S., Oubre C., Makimura K., Leys N., Grohmann E., Sugita T., Ichijo T., Nasu M. Microbial monitoring of crewed habitats in space-current status and future perspectives // *Microbes and Environments*. – 2014. – V. 29. – №. 3. – P. 250-260.
240. Yu L., Yan X., Wang L., Chu J., Zhuang Y., Zhang S., Guo M. Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from *Streptomyces rimosus* // *BMC Biotechnology*. – 2012. – V. 12. – №. 52.
241. Zea L., Prasad N., Levy S.E., Stodieck L., Jones A., Shrestha S., Klaus D. A molecular genetic basis explaining altered bacterial behavior in space // *PLoS One*. – 2016. – V. 11. – №. 11: e0164359.

242. Zgurskaya H.I. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance // International Journal of Medical Microbiology. – 2002. – V. 292. – №. 2. – P. 95–105.
243. Zhang H., Hao Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism // FASEB Journal. – 2011. – V. 25. – №. 8. – P. 2574-2582.
244. Zimmermann H., Schafer M., Schmitz C., Bucker H. Effects of heavy ions on inactivation and DNA double strand breaks in *Deinococcus radiodurans* R1 // Advances in Space Research. – 1994. – V. 14. – №. 10. – P. 213-216.
245. Zscheck K.K., Murray B.E. Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. – V. 35. – №. 9. – P. 1736–1740.