

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Еникеев Радмир

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

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2024

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель – *Захарчук Леонид Михайлович*, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты –

Лысак Людмила Вячеславовна, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра биологии почв, профессор

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», геологический факультет, кафедра геокриологии, лаборатория планетарной и исторической геокриологии, заведующий лабораторией

Ефременкова Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», сектор поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий, заведующая сектором

Защита диссертации состоится «01» октября 2024 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3053>

Автореферат разослан «12» августа 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования 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, вызывать коррозию оборудования и представлять опасность для здоровья космонавтов, 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 методик 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 значимым антибиотикам, в том числе к 9 антибиотикам, 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.

Объектами исследования являлись 28 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больничной лаборатории и идентифицированных до вида с помощью анализа генов 16S рРНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования. В опытах по определению устойчивости к антибиотикам использовали также 3 вида бацилл, выделенных ранее с поверхности оборудования РС МКС и идентифицированных с помощью молекулярных методов.

Предметом исследования являлись идентификация выделенных с рабочих поверхностей РС МКС и лаборатории для отбора проб крови штаммов бактерий рода *Bacillus*, определение устойчивости этих штаммов к двум группам клинически значимых антибиотиков, а также выявление возможных механизмов и генетических детерминант этой резистентности для определения потенциальной возможности распространения устойчивости к исследованным антибиотикам в микробиомах РС МКС и больничной лаборатории.

Научная новизна исследования. 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 с РС МКС штаммов бацилл 6 штаммов принадлежат к виду

B. paralicheniformis, что удалось установить с помощью полногеномного секвенирования.

Изучена резистентность штаммов бацилл с РС МКС и из больницы лаборатория 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.

Показано, что многие штаммы бацилл, выделенные с РС МКС и из больницы лаборатория, 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, аминогликозиды.

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*, *BcI*, *BcII*, *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 у *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 результатов исследования.

Создана коллекция штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больницы лаборатория и идентифицированных исследованием их морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков, анализом гена 16S рРНК, методами MALDI-TOF и полногеномного секвенирования.

Результаты определения резистентности штаммов бацилл, выделенных с поверхности оборудования РС МКС и больницы лаборатория, к 19 клинически значимым антибиотикам, действующим на штаммы бактерий рода *Bacillus*, в том числе к 9 антибиотикам, рекомендованным EUCAST 2021-2023, позволяет рекомендовать некоторые антибиотики из этого ряда, устойчивость бацилл к которым отсутствует, для лечения возможных вспышек инфекций, вызываемых бациллами на борту РС МКС.

Обнаружение на борту РС МКС и в больницы лаборатория 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.

Основные 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 плаزمиде.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность результатов диссертационной работы Р. Еникеева обеспечена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований с использованием современных методов исследования, рекомендованных российским и международным научным сообществом. Основные положения и результаты диссертации 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.

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.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования,

результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 245 зарубежных источников и 7 отечественных. Работа проиллюстрирована 22 рисунками и 17 таблицами.

Личный вклад соискателя. 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 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., с.н.с. Елизавете Николаевне Виноградовой. Особая благодарность к.б.н., в.н.с. Татьяне Анатольевне Алеховой за предоставление проб с РС МКС.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обосновывается актуальность темы исследования, а также формулируются цель и задачи исследования.

Обзор литературы включает характеристику микробных сообществ таких асептических помещений, как МКС и больничные учреждения. Рассматриваются факторы космического полета и их влияние на микроорганизмы, основные источники, пути формирования и характеристика микробного сообщества МКС, влияние предполетной подготовки и условий полета на микробиоту станции и иммунитет космонавтов. Подробно обсуждаются механизмы устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. Большинство штаммов бактерий рода *Bacillus*, использованных в работе, были выделены и идентифицированы автором с помощью физиолого-биохимических и молекулярных методов. В некоторых опытах использовали виды бацилл, выделенные ранее с поверхности оборудования РС МКС и идентифицированные с помощью молекулярных методов: *B. pumilus* 8-12 (ВКПМ: В-12640), *B. subtilis* 14-12 (ВКПМ: В-12636), *B. licheniformis* 7-12 (ВКПМ: В-12638), эти штаммы содержатся в коллекции культур ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». Использовали 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.

Отбор проб с поверхностей различных приборов РС МКС в зонах возможного скопления микроорганизмов осуществлялся космонавтами РС МКС на орбите Земли с помощью ватных тампонов на площади 100 см². Пробы в ячейках специальной укладки доставлялись на Землю для микробиологического анализа. В больничной лаборатории пробы отбирали аналогично до начала работы лаборатории, через 10 мин после

ночного УФ-облучения и утренней антисептической обработки рабочих поверхностей дезинфицирующими растворами.

Исследование морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий проводили с применением соответствующих руководств (Герхардт, 1981).

Получение первичных изолятов бактерий осуществляли высевом образцов материалов, отобранных на РС МКС и в больничной лаборатории, на поверхность таких питательных сред: мясо-пептонный агар (МПА) с 1% глюкозы и 0,5 % дрожжевого экстракта с pH=7,2 и БСА с pH 6,9. Образцы материалов, полученные из РС МКС в специальной упаковке в виде ватных палочек со смывом микроорганизмов с площадей оборудования МКС в 100 см², вымачивали в пробирках с 3 мл стерильного физраствора в течение 4 часов с использованием установки Вортекс V-1. Затем 20-100 мкл полученной суспензии наносили на поверхность соответствующей плотной питательной среды в чашке Петри и распределяли стерильным шпателем. Культивирование бактерий и анализ их роста осуществляли при температуре 30°C в течение 24–240 ч.

Идентификация бактерий путем анализа генов 16S рРНК (Jand., Abbot, 2007). Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных в жидкой среде с мясо-пептонным бульоном (МПБ) и 1% глюкозы, проводили с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit KO 512 (Thermo Scientific, США) по методике производителя. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров (Синтол, Россия) B63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3) и B1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ 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.

Идентификацию бактерий методом MALDI-TOF осуществляли для подтверждения данных по идентификации бактерий, полученных анализом генов 16S рРНК. Идентификацию проводили методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией на приборе MALDI-TOF Fautoflex III L200 Biotyper (Bruker, Германия) (Hrabak et al., 2013).

Определение значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков (МИК) проводили методом их последовательных двукратных разведений с использованием 96-луночных планшетов (Eppendorf, Германия). Для этого выращивали суточную культуру бактерий в МПБ с 1% глюкозы до оптической плотности 1,0 (OD 600 нм), после чего культуру клеток разбавляли средой МПБ до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и вносили в лунки. Затем в лунки вносили антибиотик таким образом, чтобы его концентрация в первой лунке составляла 4096 мкг/мл с последующим двукратным разведением до концентрации 2 мкг/мл. В работе использовали 9 β-лактамовых антибиотиков и аминогликозидный антибиотик спектиномицин. Рост бактерий оценивали, добавляя в лунки резазурин (Sigma, США) до концентрации 50 мкМ (Elshikh et al., 2016).

Оценка активности эффлюкс-систем проводилась в 96-луночных планшетах, в лунки которых вносили питательную среду и соответствующий антибиотик в концентрации от 4096 до 2 мкг/мл, как описано выше, а затем в каждую лунку добавляли протонофор – карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон (Carbonyl Cyanide 3-

Chlorophenylhydrazone, СССР, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. В качестве контролей использовали лунки с антибиотиком, но без добавления СССР, а также лунки, содержащие только питательную среду с культурой и СССР. Планшеты инкубировали в течение суток при 37°C. О влиянии СССР на рост бактерий судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ (Elshikh et al., 2016). Об активности эффлюкса судили по отношению кратности уменьшения (КУ) МИК антибиотиков в культурах без СССР к значениям МИК при его добавлении. При величине КУ<4 регистрировали отсутствие эффлюкса, при КУ в диапазоне от 4 до 16 отмечали его умеренную активность, а при КУ>16 фиксировали высокую активность (Ardebili et al., 2014).

Активность металло-β-лактамаз (МБЛ) изучали методом бумажных дисков с ЭДТА (Aoki et al., 2010). Суспензию клеток распределяли шпателем по поверхности агара Мюллера-Хинтон. Затем в центр среды помещали бумажный диск с 10 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, а на расстоянии 15 мм от него диски с антибиотиками. 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. Образование зоны подавления роста бактериального газона между диском с ЭДТА и диском, содержащим антибиотик, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемой бактерии.

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.

Оценка чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом осуществлялась с использованием 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, рН = 7,0. Суспензию бактерий с 0,5 единиц по стандарту мутности Мак-Фарланда наносили на поверхность питательной среды в чашках Петри в количестве 200 мкл и распределяли с помощью стеклянного шпателя. Диски с антибиотиками (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Россия) наносили на поверхность засеянной среды через 15 мин после инокуляции среды в чашках суспензией бактерий. Через 15 мин чашки с дисками помещали в термостат и инкубировали при 35°C в течение 20 ч (EUCAST, 2021-2023). Определяли специфические значения диаметров зон подавления роста бактерий антибиотиками, используемыми для оценки штаммов, в соответствии с клиническими категориями «чувствительный» или «резистентный» по таблицам критериев интерпретации результатов, представленным European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021-2023).

Для полногеномного секвенирования выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на 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 Mi Seq (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 CARD (Alcock et al., 2023).

Результаты в их конечном виде получали путем вычисления среднего арифметического (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 $|X_n - X| = t \sigma$, 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 без учета « X ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Бактериальная обсемененность поверхностей оборудования РС МКС

Из 26 точек отбора проб осенью 2018 года бактерии всех физиологических групп на среде МПА+1% глюкозы+0,5% дрожжевого экстракта были обнаружены в 23 точках из 26 (20 основных и 6 дополнительных). Общее количество КОЕ бактерий всех групп в точках, в которых они были обнаружены, варьировало от 0 до 2940 КОЕ/100 см². (Таблица 1). Однако, общее количество КОЕ бактерий всех физиологических групп на поверхности оборудования ни в одной из этих точек 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. Во всех 23 точках отбора, в которых обнаружены КОЕ бактерий всех групп, обнаружены и колонии бактерий рода *Bacillus*. В точках с максимальным количеством бацилл – 1, 3, 4, 5, 8, 12 и 13 количество их КОЕ/100 см² составляло 1029, 1002, 795, 436, 236, 424 и 625 соответственно (Таблица 1). Количество КОЕ бацилл по отношению к общему количеству КОЕ всех других групп бактерий на чашках в этих точках составляло от 25% до 76 % (Таблица 1).

2. Идентификация штаммов бактерий рода *Bacillus*

В ходе настоящей работы были использованы штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные ранее с РС МКС и идентифицированные до вида как *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, а также 28 новых штаммов бацилл, выделенных из проб, полученных с РС МКС и из больничной лаборатории и идентифицированных уже в ходе настоящей работы (Таблица 2).

2.1. Идентификация штаммов бактерий, полученных с РС МКС

Практически все новые штаммы бацилл с РС МКС, кроме *Bacillus* sp. SE132, удалось идентифицировать до вида (Таблица 2). 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 однозначный результат идентификации методами анализа 16S рРНК и MALDI-TOF. 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*. Установлено также, что штаммы бацилл с РС МКС, идентифицированные по методу MALDI-TOF как *B. licheniformis* SE131, SE181, SE182, следует отнести по результатам секвенирования к *B. paralicheniformis* SE131, SE181, SE182 (Таблица 2).

Таблица 1. Общее количество КОЕ бактерий всех групп и количество КОЕ бацилл на 100 см² в пробах с РС МКС при высеве образцов на МПА+1% глюкозы+0,5% 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 %).
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%)

2.2. Идентификация штаммов бактерий из больницы лаборатория

Из двадцати изолятов, полученных из медицинской лаборатории, по макроморфологическим (колонии) и микроморфологическим характеристикам были отобраны пять, доминирующих по частоте встречаемости их колоний на плотных средах. Эти изоляты были определены до вида с помощью анализа 16S рРНК и методом MALDI-TOF как *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09. Поскольку эти виды показали устойчивость к антибиотикам, было осуществлено также их полногеномное секвенирование для определения генетических детерминант резистентности к антибиотикам (Таблица 2). Таким образом, с использованием анализа гена 16S рРНК, методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлена принадлежность 31 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и медицинской лаборатории, всего к семи видам этого рода – *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*,

B. licheniformis, *B. paralicheniformis* (Таблица 2).

Таблица 2. Идентификация изолятов 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	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.

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

В этой части работы изучали резистентность *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, выделенных из образцов, доставленных с РС МКС и идентифицированных 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. Для сравнительного изучения использованы также штаммы из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ: *B. licheniformis* КМ МГУ 14, *B. pumilus* КМ МГУ 364 и *B. subtilis* КМ МГУ 25 (Таблица 2).

В начале настоящей работы отсутствовал 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*, выделенные 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 цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуросим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений, а также аминогликозид спектиномицин (Таблица 3).

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков (мкг/мл) у бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории.

Штамм	Антибиотик									
	Пенициллин	Ампициллин	Цефазолин	Цефуросим	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.

3.1. Минимальная ингибирующая концентрация антибиотиков у штаммов с РС МКС и больничной лаборатории

Установлено, что все штаммы устойчивы к пенициллину и ампициллину со значением МИК от 16 до 2048 мкг/мл, а также к антибиотикам цефалоспоринового ряда и меропенему со значением МИК от 2 до 2048 мкг/мл. Резистентность бактерий к

спектиномицину, применяемому у пациентов с аллергией на β -лактамы пенициллины и цефалоспорины, находится в диапазоне МИК от 16 до 2048 мкг/мл (Таблица 3).

3.2. 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 4). 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 цефалоспоринов III-IV-го поколений цефтриаксону, цефтазидиму, цефепиму и аминогликозиду спектиномицину, очевидно также обеспечивается системами эффлюкса, относящимися к группе второстепенных транспортеров, функционирующих за счет электрохимического потенциала мембраны (Таблица 4).

Таблица 4. Значения МИК антибиотиков и активность эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus*, 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

3.3. Активность эффлюкс-насосов и наличие β -лактамаз у штаммов *Bacillus* из больничной лаборатории

Активность эффлюкс-насосов. 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 3). 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 5). 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 5).

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 5). Действие эффлюкса у *B. cereus* HSA03 изучали в вариантах с цефазолином, 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.

Наличие β -лактамаз. Различают сериновые β -лактамазы молекулярных классов С, А, D и металло- β -лактамазы (МБЛ) класса В (Bush, 2018). На рисунке 1 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 5). 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. У *B. subtilis* HSA06, характеризующегося достаточно высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 256 мкг/мл, 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 5). *B. amyloliquefaciens* HSA09, показавший очень низкие значения МИК в отношении исследуемых цефалоспоринов, но отличающийся высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл (Таблица 3), показал умеренную активность эффлюкса в отношении этих двух антибиотиков, однако активность МБЛ обнаружена только к ампициллину (Таблица 5).

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 ни один из перечисленных типов β -лактамаз выявить не удалось (Таблица 5). Таким образом, у бацилл из больничной лаборатории резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в

зависимости от штамма и конкретного антибиотика, металло-β-лактамазы и/или эффлюкс-насосы.

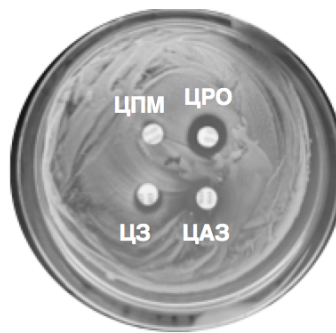
Таблица 5. Значения МИК антибиотиков, активность эффлюкс-насосов и наличие β-лактамаз у штаммов бацилл из больничной лаборатории для пенициллинов и цефалоспоринов.

Микроорганизм	Антибиотик	МИК мкг/мл	МИК мкг/мл + СССР	Кратность уменьше- ния	Активность эффлюкса	Металло- β-лак- тамазы (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	Цефуросим	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	Цефуросим	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	Цефуросим	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.



Опыт



Контроль

Рисунок 1. 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).

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

4.1. 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 в 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), цiproфлоксацин, 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.

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

В данной части работы по определению резистентности бацилл к антибиотикам, рекомендованным EUCAST, исследовали 23 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС, а также 5 штаммов – *B. cereus* HSA01, *B. cereus*, HSA03, *B. cereus* HSA12, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09, полученных из больничной лаборатории – итого 28 штаммов (Таблица 6).

4.3. Определение чувствительности к антибиотикам

У бацилл, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, изучали устойчивость к действию антибиотиков, рекомендованных EUCAST, диско-диффузионным методом (Таблица 6). Показано, что у 11 штаммов бацилл из 28 изученных, обнаружена резистентность к эритромицину и 5 штаммов показали устойчивость к клиндамицину. При этом все шесть штаммов *B. paralicheniformis* с РС МКС оказались резистентными к эритромицину и клиндамицину. Штаммы *B. cereus* SE42, SE43, LR2HG21, полученные с РС МКС, а также *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, выделенные из больничной лаборатории, показали устойчивость к фторхинолонам: цiproфлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину. К линезолиду показали устойчивость три штамма из больничной лаборатории – *B. cereus* HSA01, *B.*

cereus HSA03, *B. cereus* HSA12 (Таблица 6). У каждого из *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12, а также у *B. safensis* HEP3B2, *B. safensis* SE192 и *B. subtilis* SE171 установлена резистентность к β-лактаму имипенему (Таблица 6).

Таблица 6. Резистентность к антибиотикам, рекомендованным EUCAST, у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории.

№	Штамм бактерий	Антибиотик								
		Имипенем	Меропенем	Цифрофлоксацин	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;

4.4. 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, с целью определения наличия генов устойчивости к этим антибиотикам (Таблица 7).

Таблица 7. Гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с РС МКС и больничной лаборатории, по результатам полногеномного 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>BcII</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>BcI</i>	97 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
		<i>BcII</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>BcI</i>	97 & 101	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация
		<i>BcII</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.</i>	<i>ermD</i>	98 & 100	Макролиды, линкозамиды,	Изменение мишени

	<i>paralicheniformis</i> SE181			стрептограмин, стрептограмин А и В	
		<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</i> <i>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, плевромутилин	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</i> <i>mprF</i>	100 & 100	Пептидные антибиотики	Изменение мишени
		<i>vmlR</i>	100 & 100	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	Защита мишени действия
		<i>APH(3')-IIa</i>	100 & 100	Аминогликозиды	Инактивация

Для анализа последовательностей бактериальной ДНК и определения генов устойчивости к антибиотикам (antimicrobial resistance genes, ARGs) использовали базу данных CARD. С целью обеспечения высокой точности идентификации ARGs в результаты исследований (Таблица 7) 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 (> 90 & 90%). Этот подход позволил с высокой достоверностью идентифицировать гены, кодирующие резистентность к определенным антибиотикам. В качестве примера на рисунке 2 желтым цветом выделены гены ARGs *B. cereus* SE43 и *B. paralicheniformis* SE71, а на рисунке 3 – гены *B. cereus* LR2HG21 и *B. subtilis* SE171, отвечающие критериям > 90 & 90%.

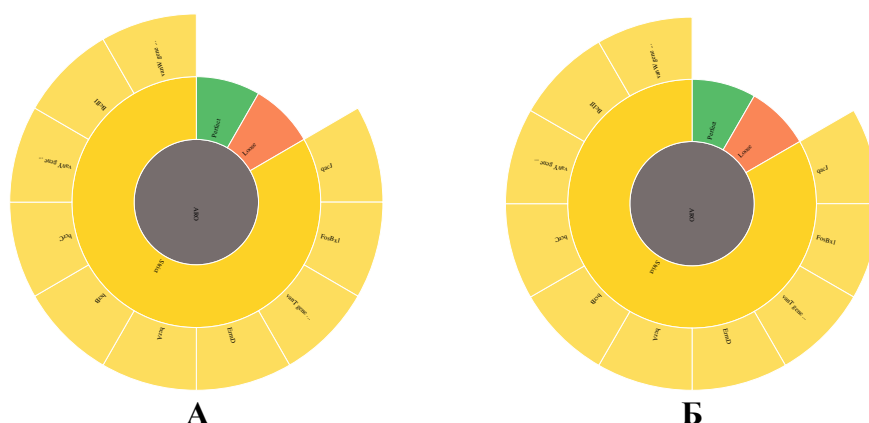


Рисунок 2. Гены резистентности, выявленные с помощью базы данных CARD по результатам полногеномного секвенирования штаммов *B. cereus* SE43 (А) и *B. paralicheniformis* SE71 (Б). Зеленым цветом выделены гены, показавшие «идеальное» (100 & 100 %) совпадение по идентичности и длине с эталонными последовательностями базы данных CARD, желтым цветом обозначены частичные совпадения (> 90 & 90%).

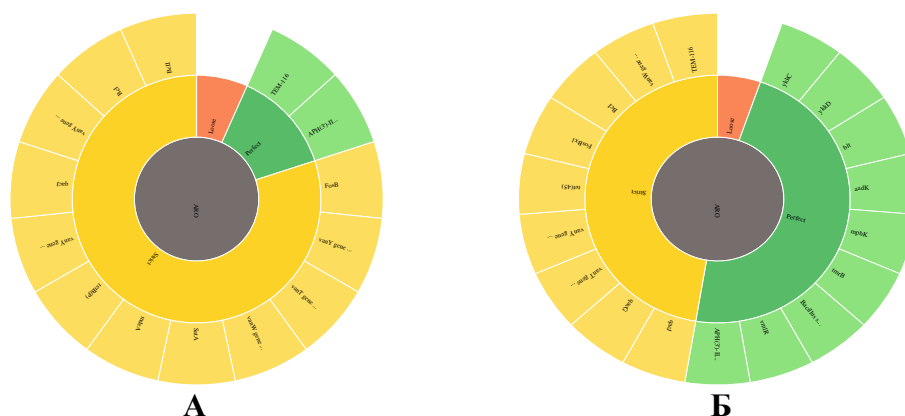


Рисунок 3. Гены резистентности, выявленные с помощью базы данных CARD, по результатам полногеномного секвенирования штаммов *B. cereus* LR2HG21 (А) и *B. subtilis* SE171 (Б). Отмечены желтым и зеленым цветом соответственно > 90 & 90% и 100 & 100 % («идеальные») совпадения генов по идентичности и длине 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.

На рисунке 3 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. «Идеальные» совпадения означают 100% совпадения генов по идентичности и 100% совпадения по длине с последовательностями генов в базе CARD.

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 7). У резистентного к эритромицину штамма *B. cereus* SE43 (Таблица 6), не имеющего генов *erm*, обнаружен хромосомный ген *mphL* (Таблица 7), кодирующий макролидные фосфотрансферазы, инактивирующие 14-15-членные макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*. Ген *mphL* 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 6), у двух из них – *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 обнаружен ген *mphK* (Таблица 7), 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 -лактамам антибиотикам (Таблица 7). Ген *TEM-116* кодирует β -лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС), обуславливающую резистентность к пенициллинам, цефалоспорином, имипенему путем их гидролиза.

У *B. cereus* HSA01 и *B. cereus* HSA03, выделенных из больничной лаборатории и проявивших устойчивость к β -лактаму имипенему (Таблица 6) с помощью полногеномного секвенирования выявлено наличие генов *BcI* и *BcII* (Таблица 7). У штамма *B. cereus* LR2HG21, резистентного к имипенему и меропенему, секвенирование показало наличие только гена *BcII* (Таблица 7). 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). Секвенирование *B. cereus* LR2HG21 обнаружило у этого штамма (Таблица 7) ген *APH(3')-IIa*, кодирующий аминогликозид-3'-О-

фосфотрансферазы и объясняющий у *B. cereus* LR2HG21 устойчивость к аминогликозиду спектиномицину (Таблица 3). Следует отметить, что гены *TEM-116* и *APH(3')-IIIa* у исследованных бацилл показали «идеальные» 100 % совпадения данных секвенирования с базой данных CARD по идентичности и длине последовательностей генов (Таблица 7).

Резистентность к фторхинолонам ципрофлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину обнаружена у четырех штаммов *B. cereus* – LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 (Таблица 7). 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 Gyr A и Par C 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 7 включены также гены резистентности, обнаруженные у исследованных видов бацилл 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*. Наличие этих генов подтверждает наличие у исследованных штаммов бацилл МЛУ (Таблица 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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), что связано с высокой устойчивостью бацилл к высушиванию, недостатку питательных веществ, адгезией к любым поверхностям, включая нержавеющую сталь, способностью формировать биопленки (Chęcinska et al., 2015; Majed et al., 2016).

Число известных видов рода *Bacillus* уже превышает 260, однако идентификация штаммов, выделенных нами из 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 31 штамма бацилл, выделенных из поверхностей оборудования РС МКС и больницы лаборатории, 6 штаммов идентифицированы как *B. cereus* (Таблица 2). *B. cereus*, является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл, синтезирующим широкий спектр потенциальных факторов вирулентности, включая токсины и ферменты, разрушающие ткани (Zhang et al., 2019). 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 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 3, 4, 5, 6). 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.

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 (Таблица 7). 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 (Verbers et al., 2020; Sultan et al., 2020) или генами *BclI* и *BclII*, обеспечивающими резистентность к имипенему и меропенему (Meini et al., 2015; Nolivos et al., 2019), которые могут находиться как в хромосоме, так и в плаزمиде.

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 из 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS 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) [Yenikeyev R.R., Zakharchuk L.M. Bacteria of the genus *Bacillus* on the Russian segment of the International Space Station // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2023. V. 78. №. 3. P. 163-171. DOI: 10.3103/S0096392523700062. (SJR = 0.18, Q 3)]. Вклад автора в печатных листах: (0,5/0,4). (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Еникеев Р.Р., Татаринова 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) [Yenikeyev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M., Vinogradova E.N. Mechanisms of Resistance to Clinically Significant Antibiotics in *Bacillus* Strains Isolated from Samples Obtained from a Medical Institution // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2022. V. 77. P. 84–91. DOI: 10.3103/S009639252202002X. (SJR = 0.18, Q 3)]. (0,5/0,35).

3. Еникеев Р.Р., Татаринова 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) [Yenikeyev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M. Mechanisms of Resistance to Clinically Significant Antibiotics of Bacterial Strains of the Genus *Bacillus* Isolated from Samples from the International Space Station // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2020. V. 75. P. 224–230. DOI: 10.3103/S0096392520040045. (SJR = 0.18, Q 3)]. (0,5/0,4).