

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 579.65

Бактерии рода *Bacillus* на Международной космической станции

Р.Р. Еникеев* , Л.М. Захарчук

Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com

С поверхностей оборудования российского сегмента Международной космической станции получены чистые культуры 19 штаммов спорообразующих бактерий. Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств этих бактерий позволило отнести все штаммы к роду *Bacillus*. В результате использования методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлено, что из 19 штаммов бацилл шесть принадлежат к виду *B. paralicheniformis*, четыре — к *B. pumilus*, четыре — к *B. subtilis*, два — к *B. cereus* и один — к *B. amyloliquefaciens*. В соответствии с требованиями и нормами EUCAST 2023 изучена устойчивость полученных из российского сегмента Международной космической станции штаммов бацилл к таким антибиотикам, как имипенем, меропенем, цiproфлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид. У 11 штаммов бацилл обнаружена резистентность к эритромицину, у пяти штаммов — к клиндамицину. Лишь по одному штамму проявили резистентность к имипенему, левофлоксацину и норфлоксацину соответственно. Анализ полного генома штаммов бактерий, у которых была обнаружена устойчивость к эритромицину и/или клиндамицину, позволил установить, что резистентность к этим антибиотикам у *B. paralicheniformis* штаммов SE71, SE131, SE181, SE182 и SE183 обеспечивает ген резистентности к антибиотикам *ermD*. У *B. cereus* SE43 устойчивость к эритромицину кодирует ген *mphL*.

Ключевые слова: Российский сегмент Международной космической станции, бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, гены устойчивости, *Bacillus cereus*, *Bacillus paralicheniformis*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-5

Введение

Исследования состояния здоровья космонавтов на Международной космической станции (МКС) показывают, что работа в космосе приводит к потере мышечной массы, ухудшению зрения, снижению иммунитета, стрессам и нарушениям в микробиоме [1]. Важно, что в космосе люди зависят от наземной службы поддержки — в частности, не могут пользоваться клиническим сопровождением, поэтому особенно уязвимы к заболеваниям. МКС представляет собой замкнутое пространство с постоянной температурой, повышенной влажностью, наличием доступных субстратов и является благоприятной средой для развития микроорганизмов. Микробиом МКС напоминает некоторые микробиомы «закрытых помещений» на Земле — домов, офисов, больниц и содержит множество бактерий, грибов и вирусов [2]. Исследования микробиома МКС показали, что там встречаются в основном представители родов *Bacillus*, *Micrococcus* и *Staphylococcus* [3]. Сле-

довательно, на борту МКС особенно важную роль играют спорообразующие представители *Bacillus*, способные выживать в неблагоприятных условиях среды. При этом известно, что некоторые виды бацилл способны вызывать заболевания [4].

Целями настоящей работы стало выделение с рабочих поверхностей российского сегмента Международной космической станции (РС МКС) изолятов спорообразующих штаммов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, изучение физиолого-биохимических свойств, а также определение устойчивости к ряду клинически значимых антибиотиков и выявление возможных механизмов этой резистентности.

Материалы и методы

Отбор проб с поверхностей приборов РС МКС, их доставку на Землю, а также получение первичных изолятов бактерий и чистых культур спорообразующих бактерий осуществляли, как описано ранее [5]. При исследовании морфологи-

ческих, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий, а также дифференциация бактерий рода *Bacillus* от представителей сходных родов бактерий, образующих эндоспоры, основывались на соответствующих руководствах [6]. Первичную идентификацию чистых культур бактерий, по сумме признаков предположительно относящихся к роду *Bacillus*, осуществляли методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) на приборе MALDI-TOF autoflex III L200 (Biotyper Bruker, Германия) [7]. Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом использовали агар 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, pH = 7,0 [8]. Суспензию бактерий 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 [8]. Определяли специфические значения диаметров зон подавления роста бактерий антибиотиками, используемыми для оценки штаммов, в соответствии с клиническими категориями «чувствительный», «резистентный» или «зона технической неопределенности» по таблицам критериев интерпретации результатов, представленным European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [8]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясопептонным бульоном и 1% глюкозы, проводили с помощью набора реактивов FastDNA 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 Kapa Hyperplus (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные последовательности были идентифицированы с использованием программы сверхбыстрой классификации метагеномных последовательностей Kraken [9]. Установление наличия в геноме штаммов бактерий рода *Bacillus* генов устойчивости к антибиотикам осуществляли с помощью базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [10]. 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 $|X_n - X| = t \cdot \sigma$, 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 без учета «X»:

$$\pm \sqrt{\frac{\sum (X_n - X)^2}{n - 1}}.$$

Результаты и обсуждение

Получение и первичная характеристика штаммов бактерий. Получение первичных изолятов бактерий осуществляли высевами образцов материалов, отобранных на РС МКС, на поверхность плотных питательных сред — таких как мясопептонный агар с 1% глюкозы и бульон сусло-агар. Из первичных изолятов были получены чистые культуры спорообразующих бактерий. Затем исследовали морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки соответствующих штаммов. Определяли такие свойства выделенных бактерий, как форма и диаметр клеток, образование эндоспор, окраска по Граму, отношение к кислороду, способность синтезировать каталазу и оксидазу, образование кислоты при сбраживании глюкозы, гидролиз крахмала, восстановление нитратов и некоторые другие физиологические и биохимические признаки (табл. 1). По сумме фенотипических признаков осуществлена дифференциация исследуемых штаммов от бактерий сходных родов, образующих эндоспоры, что позволило предположительно отнести 19 штаммов спорообразующих бактерий к роду *Bacillus* (табл. 1).

Идентификация штаммов с помощью MALDI-TOF. Дальнейшую идентификацию штаммов бактерий, по сумме признаков предположительно отнесенных к роду *Bacillus*, осуществляли методом MALDI-TOF [7]. Все 19 штаммов бактерий с использованием масс-спектрометрии были отнесены к роду *Bacillus* и идентифицированы до вида как *B. subtilis* (четыре штамма), *B. pumilus* (четыре штамма), *B. licheniformis* (три штамма), *B. cereus* (два штамма). При этом шесть штаммов бактерий рода *Bacillus* из 19 — SE21, SE41, SE71, SE132, SE161, SE183 — методом MALDI-TOF до вида идентифицировать не удалось (табл. 2).

Определение чувствительности к антибиотикам. У идентифицированных с помощью метода MALDI-TOF бактерий изучали устойчивость к действию ряда антибиотиков диско-диффузионным методом [8]. В последнем выпуске EUCAST 2023 [8] присутствуют критерии интерпретации для оценки устойчивости бактерий *Bacillus* spp. с помощью диско-диффузионного метода для таких антибиотиков, как имипенем, меропенем, ци-

профлосаксин, левофлосаксин, норфлосаксин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид, поэтому именно эти антибиотики были использованы в нашей работе. По размерам зон подавления роста штамма бактерии соответствующим антибиотиком этот штамм, в соответствии с таблицами, представленными в EUCAST 2023, можно было отнести к категориям чувстви-

тельный (S), резистентный (R) или к категории ATU – зоне технической неопределенности. Изучение устойчивости к перечисленным антибиотикам 19 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из РС МКС, показало, что почти все 19 штаммов бацилл, выделенных из РС МКС, проявляют чувствительность к первым двум исследуемым антибиотикам – имипенему и меропенему (табл. 2).

Таблица 1

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
Диаметр клетки > 1 мкм	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Форма спор, округлые	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Параспоральные кристаллы	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP-тест	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост при 50°C	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Анаэробный рост	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	–	–
Образование кислоты при росте на глюкозе	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование газа при росте на глюкозе	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–
Восстановление нитратов	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–
Использование цитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Разложение тирозина	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 2

Диаметры зон подавления роста штаммов бактерий рода *Bacillus* (в миллиметрах), выделенных из РС МКС, на среде Мюллера-Хинтона под действием дисков с разными антибиотиками

Идентификация штаммов на основании MALDI-TOF	Антибиотик									Идентификация штаммов на основании полногеномного секвенирования
	Имипенем	Меропенем	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Норфлоксацин	Ванкомицин	Эритромицин	Клиндамицин	Линезолид	
<i>B. subtilis</i> SE12	40 (S)	40 (S)	35 ATU	35 ATU	28 (S)	25 (S)	30 (S)	30 (S)	40 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE21	40 (S)	40 (S)	35 ATU	36 ATU	25 (S)	20 (S)	22 (R)	30 (S)	26 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE41	32 (S)	32 (S)	30 ATU	30 ATU	25 (S)	18 (S)	21 (R)	30 (S)	40 (S)	<i>B. amyloliquefaciens</i> SE41
<i>B. cereus</i> SE42	32 (S)	38 (S)	25 ATU	22 (R)	30 (S)	20 (S)	28 (S)	25 (S)	34 (S)	<i>B. cereus</i> SE42
<i>B. cereus</i> SE43	34 (S)	37 (S)	26 ATU	25 ATU	20 (R)	16 (S)	17 (R)	30 (S)	30 (S)	<i>B. cereus</i> SE 43
<i>B. pumilus</i> SE4	35 (S)	35 (S)	35 ATU	35 ATU	32 (S)	30 (S)	35 (S)	35 (S)	45 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE62	40 (S)	40 (S)	35 ATU	38 ATU	30 (S)	19 (S)	20 (S)	30 (S)	29 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE71	32 (S)	30 (S)	32 ATU	30 ATU	30 (S)	20 (S)	16 (R)	11 (R)	35 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE71
<i>B. licheniformis</i> SE131	35 (S)	35 (S)	30 ATU	26 ATU	26 (S)	21 (S)	3 (R)	12 (R)	34 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE131
<i>Bacillus</i> sp. SE132	42 (S)	40 (S)	32 ATU	32 ATU	26 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)	30 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE15	35 (S)	35 (S)	35 ATU	30 ATU	30 (S)	26 (S)	2 (R)	25 (S)	35 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE161	40 (S)	37 (S)	25 ATU	29 ATU	30 (S)	24 (S)	4 (R)	13 (R)	40 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE161
<i>B. pumilus</i> SE171	38 (S)	40 (S)	35 ATU	37 ATU	26 (S)	21 (S)	15 (R)	30 (S)	30 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE17	40 (S)	40 (S)	28 ATU	27 ATU	27 (S)	24 (S)	28 (S)	20 (S)	31 (S)	
<i>B. licheniformis</i> SE181	36 (S)	40 (S)	35 ATU	35 ATU	30 (S)	23 (S)	17 (R)	14 (R)	35 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE181
<i>B. licheniformis</i> SE182	30 (S)	30 (S)	34 ATU	29 ATU	24 (S)	20 (S)	20 (R)	21 (S)	30 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE182
<i>Bacillus</i> sp. SE183	40 (S)	40 (S)	31 ATU	32 ATU	31 (S)	22 (S)	20 (R)	15 (R)	28 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE183
<i>B. pumilus</i> SE191	31 (S)	31 (S)	31 ATU	35 ATU	25 (S)	19 (S)	28 (S)	20 (S)	28 (S)	
<i>B. pumilus</i> SE192	29 (R)	25 (S)	33 ATU	33 ATU	25 (S)	20 (S)	30 (S)	25 (S)	26 (S)	

Примечание: знак S означает чувствительный штамм; R – резистентный; ATU – зона технической неопределенности.

Только у *B. pumilus* SE192 обнаружена устойчивость к имипенему. Опыты с еще двумя антибиотиками — ципрофлоксацином и левофлоксацином — показали принадлежность штаммов в основном к категории АТУ (табл. 2), когда по зонам подавления роста бактерий на основании имеющихся в литературе данных трудно или невозможно определить клиническую эффективность и возможность практического применения препаратов для лечения больных без получения дополнительных данных [8]. И только один штамм — *Bacillus* sp. SE42 показал устойчивость к левофлоксацину (табл. 2). К следующим антибиотикам — норфлоксацину и ванкомицину — почти все штаммы также проявили чувствительность, кроме штамма *B. cereus* SE43, проявившего устойчивость к норфлоксацину (табл. 2). Особенно интересные результаты получились при использовании для подавления роста бактерий дисков с эритромицином. У 11 штаммов из 19 обнаружена резистентность к этому антибиотику (табл. 2). Следующим антибиотиком был клиндамицин, к которому пять штаммов бацилл показали устойчивость. А к последнему из исследуемых антибиотиков — линезолиду — все 19 штаммов *Bacillus* проявили чувствительность (табл. 2). Следует отметить, что 5 из 19 штаммов бацилл — SE71, SE131, SE161, SE181 и SE183 проявили устойчивость к двум антибиотикам — эритромицину и клиндамицину (табл. 2).

Полногеномное секвенирование и определение наличия генов устойчивости. С целью уточнения систематического положения штаммов бацилл, проявивших устойчивость к антибиотикам (табл. 2), а также для определения наличия генов устойчивости к этим антибиотикам было проведено полногеномное секвенирование прежде всего условных патогенов *B. cereus* SE42 и *B. cereus* SE43, а также штаммов, проявивших устойчивость к эритромицину и клиндамицину (табл. 2). Результаты полногеномного секвенирования подтвердили принадлежность штаммов SE42 и SE43 к виду *B. cereus*. Установлено также, что штаммы бацилл, идентифицированные по методу MALDI-TOF как *B. licheniformis* SE131, SE181, SE182, следует отнести 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 (табл. 2). Таким образом, в результате использования методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования удалось показать, что из 19 штаммов бацилл шесть принадлежат к виду *B. paralicheniformis*, по четыре — к *B. pumilus* и *B. subtilis*, два — к *B. cereus* и один — к *B. amyloliquefaciens* (табл. 2). С помощью данных полногеномного секвенирования штаммов, проявивших устойчивость к рекомендуемым для бацилл антибиотикам (табл. 2), с ис-

пользованием базы данных CARD [10] установлено наличие в геномах большинства штаммов бацилл, резистентных к эритромицину и клиндамицину, гена *ermD* (эритромицин-резистентная метилаза), ответственного за устойчивость к макролиду эритромицину и линкозамиду клиндамицину (табл. 3). 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-линкозамидам-стрептограмину В, при этом было показано, что гены *erm* обеспечивают перекрестную резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* и преобладают у бактерий с высокой мультirezистентностью [11, 12]. 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 [13]. Следовательно, устойчивость к эритромицину у бацилл очень хорошо коррелирует с наличием гена *ermD*. Ген *ermD* обнаружен нами у штаммов *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 (табл. 3). 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 [11, 13]. Кроме генов *ermD* у бактерий *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 обнаружены гены устойчивости к бацитрацину *bcrA*, *bcrB* и *bcrC* (табл. 3). Эти гены кодируют АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ATP-binding cassette), обычно участвующие в транслокации родственных им субстратов, которая управляется гидролизом АТФ. Переносчик BcrABC обеспечивает иммунитет к синтезирующему бацитрацин штамму *B. licheniformis* [14]. В этой системе белки BcrB и BcrC образуют трансмембранный канал, в то время как два белка BcrA функционируют как АТФазы, обеспечивающие транспорт энергии. Механизм устойчивости к бацитрацину, обеспечиваемый переносчиками Bcr, универсален — он одинаково функционален как у *B. subtilis*, так и у граммотрицательной кишечной палочки [14].

У резистентного к эритромицину штамма *B. cereus* SE43, не имеющего генов *erm*, обнаружен ген *mphL* (табл. 3). 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* [15]. Ферменты Mphs инактивируют макролид путем его модификации фосфорилированием 2'-ОН незаменимого диметиламиносахара, 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 различ-

ными плазмидными последовательностями, что позволяет предположить, что этот ген является геном приобретенной резистентности. Напротив, ген *mph* кластера А расположен в хромосомной области, консервативной среди 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. У резистентного к эритромицину *B. cereus* SE43 обнаружен также ген *bcl-1* (табл. 3), кодирующий хромосомную β-лактамазу

Таблица 3

Гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные у штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием базы данных CARD

Идентификация штаммов на основании полногеномного секвенирования	Ген	Кодирует действие на классы антибиотиков	Механизм действия	Ссылка
<i>B. cereus</i> SE42	<i>clbA</i>	линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	изменение мишени антибиотика	[20]
	<i>bcl-1</i>	цефалоспорины, пенициллины	инактивация антибиотика	[16]
<i>B. cereus</i> SE43	<i>satA</i>	нуклеозидные антибиотики	инактивация антибиотика	[17]
	<i>bcl-1</i>	цефалоспорины, пенициллины	инактивация антибиотика	[16]
	<i>bla2</i>	карбапенем, цефалоспорин, пенам	инактивация антибиотика	[18]
	<i>mphL</i>	макролиды	инактивация антибиотика	[15]
	<i>fosB</i>	фосфомицин	инактивация антибиотика	[19]
<i>B. paralicheniformis</i> SE71	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE131	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE181	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE182	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE183	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	

у *B. clausii* и активную в отношении цефалоспоринов [16], ген *satA*, кодирующий ацетилирование стрептогтрицина и блокирующий токсический эффект данного антибиотика у *B. subtilis* и *B. anthracis* [17], ген *bla2*, кодирующий металло- β -лактамазу у *B. anthracis* и обеспечивающий резистентность к цефалоспорином и карбопенему [18], ген *fosB*, кодирующий у *B. subtilis* синтез белка, обеспечивающего устойчивость к ингибитору синтеза клеточной стенки фосфомицину [19].

У чувствительного к эритромицину и клиндамицину *B. cereus* SE42 (табл. 2), обнаружен ген *bcl-1* (табл. 3), кодирующий хромосомную β -лактамазу, активную в отношении цефалоспоринов [16], а также ген *clbA*, кодируемый плазмидой и принадлежащий к кластеру генов *clb* семейства генов *cfr*, кодирующих синтез колибактина, катализирующего метилирование субъединицы 23S рРНК в С8-положении A2503. Метилирование 23S рРНК придает устойчивость к некоторым классам антибиотиков, включая линкозамид клиндамицин [20]. Однако *B. cereus* SE42, как уже говорилось, не проявил резистентности к клиндамицину (табл. 2).

Таким образом, устойчивость к эритромицину у *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 и клиндамицину у *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE183 обеспечивает ген *ermD*. У *B. cereus* SE43 устойчивость к эритромицину кодирует ген *mphL* (табл. 3).

Вид *B. paralicheniformis* (табл. 2) был выделен в отдельный вид недавно, поэтому сведений о его патогенности еще очень мало [21]. Что касается наиболее близкого к *B. paralicheniformis* по результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК вида *B. licheniformis*, то последний признан патогеном человека, вызывающим инфекции главным образом у пациентов с ослабленным иммунитетом, постоянным катетером или находящимися на автоматическом перитонеальном диализе [22, 23].

B. cereus, два штамма которого обнаружены нами на РС МКС (табл. 2), является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. Он занимает третье место после видов *Salmonella* spp. и *Staphylococcus aureus* среди инфекций, связанных с пищевыми отравлениями, и этот условно-патогенный микроорганизм способствует возникновению рвотных и диарейных синдромов у животных и людей. *B. cereus* продуцирует широкий спектр потенциальных факторов вирулентности, включая токсины и ферменты, разрушающие ткани [24]. При этом *B. cereus* формирует особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* и *B. anthracis* [25]. Некорректная антибиотикотерапия вызывает высокий уровень смертности у пациентов с бактериемией, вызван-

ной *B. cereus*, поэтому препараты для терапии должны применяться с учетом чувствительностью к ним возбудителя [4]. Однако еще мало данных о клинических характеристиках штаммов *B. cereus*, вызывающих инфекции системы кровообращения и их эмпирической терапии. Эти инфекции чаще всего связаны с такими факторами передачи, как аппараты искусственной вентиляции легких и внутрисосудистые катетеры [26]. Обнаружение на МКС условно-патогенных бактерий, обладающих резистентностью в отношении некоторых клинических антибиотиков, требует постоянного скрининга микробиоты станции для предупреждения влияния этих микроорганизмов на здоровье космонавтов.

Представители группы *B. cereus* не являются редкостью на МКС [27]. Мы обнаружили на МКС два штамма *B. cereus* и пять штаммов *B. paralicheniformis*, резистентных к эритромицину и/или клиндамицину (табл. 2). В связи с этим возник вопрос о возможности распространения на МКС устойчивости к этим антибиотикам от резистентных к ним бактерий к другим видам. Из-за тесного родства между *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* есть предположение, что *B. anthracis* является подвидом *B. cereus* и перечисленные виды бацилл подвергаются горизонтальному переносу генов и обмену плазмидами [28]. Ген *mphL*, обеспечивающий резистентность к эритромицину у *B. cereus* SE43 (табл. 3), находится в хромосомной области, консервативной у всех изолятов группы *B. cereus*, он был приобретен на ранней стадии эволюции группы *B. cereus* и является у этих бактерий геном внутренней резистентности, не связанным с плазмидными последовательностями [15]. Что касается гена *ermD*, кодирующего резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. paralicheniformis*, то он присутствует на хромосоме в эволюционных кладах *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, а также близкородственных видов *Bacillus* и, как и ген *mphL*, не связан с какими-либо мобильными генетическими элементами [13]. Следовательно, гены *ermD* и *mphL*, кодирующие устойчивость обитающих на МКС *B. paralicheniformis* и *B. cereus* к эритромицину и клиндамицину, являются хромосомными генами, поэтому, видимо, не представляют потенциальной опасности в результате их горизонтального переноса к штаммам бактерий рода *Bacillus*, обитающих на МКС [13, 15].

Исследование осуществлялось в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ №23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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;3(1):50–68.
2. 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. *Sci. Total Environ*. 2014;485–486:508–517.
3. Mora M., Wink L., Kogler I., Mahnert A., Rettberg P., Schwendner P., Demets R., Cockell C., Alekhova T., Klingl A., Krause R., Zolotarief A., Alexandrova A., Moissl-Eichinger C. Space Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health. *Nat. Commun*. 2019;10(1):3990.
4. Bianco A., Capozzi L., Monno M.R., Del Sambio L., Manzulli V., Pesole G., Loconsole D., Parisi A. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing. *Front. Microbiol*. 2021;11:599524.
5. Alekhova T.A., Zakharchuk L.M., Tatarinova N.Y., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Skryabin K.G. Diversity of bacteria of the genus *Bacillus* on board of International Space Station. *Dokl. Biochem. Biophys*. 2015;465(1):104–107.
6. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. The Firmicutes*. Eds. P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, and W.B. Whitman. N.Y.: Springer; 2009. 1450 pp.
7. Hrabak J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization time- of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013;26(1):103–114.
8. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.0. 2023. <http://www.eucast.org>.
9. Wood D.E., Salzberg S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. 2014;15(3):R46.
10. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D690–D699.
11. 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;15(4):e0231274.
12. Anjum R., Krakat N. Detection of multiple resistances, biofilm formation and conjugative transfer of *Bacillus cereus* from contaminated soils. *Curr. Microbiol*. 2016;72:321–328.
13. 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;14(1):e0210363.
14. Podlessek Z., Comino A., Herzog-Velikonja B., Grabnar M. The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000;188(1):103–106.
15. 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. *Environ. Microbiol*. 2015;17(5):1560–1573.
16. Girlich D., Leclercq R., Naas T., Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of the chromosome-encoded class A β -lactamase BCL-1 from *Bacillus clausii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51(11):4009–4014.
17. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. In *Bacillus subtilis*, the SatA (formerly YyaR) acetyltransferase detoxifies streptothricin via lysine acetylation. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017;83(21):e01590–17.
18. Bhattacharya S., Junghare V., Pandey N.K., Ghosh D. Patra H., Hazra S. An insight into the complete biophysical and biochemical characterization of novel class A beta-lactamase (Bla1) from *Bacillus anthracis*. *Intern. J. Biol. Macromolec*. 2020;145:510–526.
19. Cao M., Bernat B.A., Wang Z., Armstrong R.N., Helmann J.D. FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma (W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 2001;183(7):2380–2383.
20. Hansen L.H., Planellas M.H., Long K.S., Vester B. The order *Bacillales* hosts functional homologs of the worrisome *cfr* antibiotic resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012;56(7):3563–3567.
21. Dunlap C.A., Kwon S., Rooney A.P., Kim S. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2015;65(10):3487–3492.
22. Albaker W. Successful Treatment of *Bacillus licheniformis* peritonitis in peritoneal dialysis patient with intraperitoneal vancomycin: a case report. *Int. Med. Case Rep. J*. 2021;14:215–218.
23. Zhong C., Wang F., Zhou H., Liu J., Hu J., Chen Y. Bacteremia caused by accidental injection of *Bacillus licheniformis* microbiota modulator through the central venous catheter: a case report. *Medicine*. 2022;101(4):e28719.
24. Zhang Q., Zuo Z., Guo Y., Zhang T., Han Z., Huang S., Karama M., Saleemi M. K., Khan A., He C. Contaminated feed-borne *Bacillus cereus* aggravates respiratory distress post avian influenza virus H9N2 infection by inducing pneumonia. *Sci. Rep*. 2019;9(1):7231.
25. Schmid P.J., Maitz S., Kittinger C. *Bacillus cereus* in packaging material: molecular and phenotypical diversity revealed. *Front. Microbiol*. 2021;12:698974.
26. Hino C., Ozaki M., Kitahara T., Kouda K., Shikichi K., Nakamura I., Kawai S., Oie S. Peripheral parenteral nutrition solutions and bed bath towels as risk factors for nosocomial peripheral venous catheter-related bloodstream infection by *Bacillus cereus*. *Int. J. Med. Sci*. 2023;20(5):566–571.

27. Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I., Mergey M. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Microbiol. Res.* 2006;157(1):5–12.

28. Kaminska P.S., Yernazarova, A., Drewnowska J.M., Zambrowski G., Swiecicka I. The worldwide distribution of

genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids. *Environ. Microbiol. Rep.* 2015;7(5):738–745.

Поступила в редакцию 27.06.2023

После доработки 10.10.2023

Принята в печать 12.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Bacteria of the genus *Bacillus* on the Russian segment of the International Space Station

R.R. Yenikeev* , L.M. Zakharchuk 

Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com

Pure cultures of 19 strains of spore-forming bacteria were obtained from the equipment surfaces of the Russian segment of the International Space Station. The study of morphological, cultural and physiological-biochemical properties of these bacteria allowed us to attribute all strains to the genus *Bacillus*. As a result of using MALDI-TOF methods and genome-wide sequencing, it was found that out of 19 bacillus strains, six belong to the species *B. paralicheniformis*, four to *B. pumilus*, four to *B. subtilis*, two to *B. cereus* and one to *B. amyloliquefaciens*. In accordance with the requirements and norms of EUCAST 2023, the resistance of bacillus strains obtained from the Russian segment of the International Space Station to antibiotics such as imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, vancomycin, erythromycin, clindamycin and linezolid was studied. Resistance to erythromycin was found in 11 strains of bacilli and five strains showed resistance to clindamycin. Only one strain showed resistance to imipenem, levofloxacin and norfloxacin, respectively. Analysis of the complete genome of bacterial strains in which resistance to erythromycin and (or) clindamycin was found made it possible to establish that resistance to these antibiotics in *B. paralicheniformis* strains SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 provides the *ermD* antibiotic resistance gene. In *B. cereus* SE43, resistance to erythromycin encodes the *mphL* gene.

Keywords: Russian segment of the International Space Station, bacteria of the genus *Bacillus*, antibiotic resistance, resistance genes, *Bacillus cereus*, *Bacillus paralicheniformis*

Funding: The study was carried out within the framework of a scientific project to fulfill the state task of Moscow State University, project number 23-1-21 (registration number CITS 121032300094-7).

Сведения об авторах

Еникеев Радмир Рустамович — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8467-9051>

Захарчук Леонид Михайлович — докт. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: zakharchuk@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3783-3279>