

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.65

Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с международной космической станции**Р.Р. Еникеев^{*} , Н.Ю. Татарина , 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*

Российский сегмент Международной космической станции, как закрытая среда обитания, является благоприятной средой для развития микроорганизмов. Там встречаются бактерии и грибы разных систематических групп, некоторые из которых могут приводить к возникновению инфекций. Так, опасность представляют отдельные виды спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. У семи штаммов бактерий этого рода, выделенных из проб, полученных на станции, определена устойчивость к таким β -лактамам антибиотикам, как пенициллин, ампициллин, меропенем, ряду производных цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуроксим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений, а также аминоциклитолному антибиотику спектиномицину. Установлено, что все эти штаммы устойчивы к пенициллину и ампициллину со значением минимальной ингибирующей концентрации (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 32 до 2048 мкг/мл. Отсутствие активных эффлюкс-насосов у *B. licheniformis* 7-12 с высокими значениями МИК к пенициллину и ампициллину, позволило предположить наличие у этого штамма механизма β -лактамазной защиты от этих антибиотиков. Еще у трех штаммов, устойчивых к пенициллину и ампициллину (*B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21, *Bacillus* sp. НЕРЗВ2) функционирует другой механизм защиты – активный транспорт антибиотика из клетки, опосредованный наличием эффлюкс-насосов, функционирующих за счет электрохимического потенциала клеточной мембраны. Показано, что у шести штаммов исследованных бацилл резистентность к производным цефалоспоринов III-IV-го поколений цефтриаксону, цефтазидиму, цефепиму и аминоциклитолному антибиотику спектиномицину также очевидно обеспечивается системами активного оттока ксенобиотиков, относящимися к группе второстепенных транспортеров.

Ключевые слова: *Российский сегмент Международной космической станции, бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, минимальная ингибирующая концентрация, эффлюкс-насосы, замкнутая среда обитания*

Российский сегмент Международной космической станции (РС МКС) представляет собой уникальную замкнутую среду обитания, которая отличается постоянной температурой (около 22°C), повышенной влажностью, более высокими, чем на Земле, уровнями космического излучения и углекислого газа, наличием доступных органических субстратов, микрогравитацией и постоянным проживанием людей. Совокупность этих условий является благоприятной средой для развития микроорганизмов [1]. Наряду с различными видами грибов на РС МКС встречаются и прокариоты различных систематических групп [2]. Грибы и бактерии, обитающие на борту МКС, могут нарушать работу систем жизнеобеспечения, представлять опасность для здоровья космонавтов

и вызывать коррозию оборудования, поэтому на пилотируемых космических аппаратах большое внимание уделяется постоянному мониторингу состава микробных сообществ [3]. Причиной микробной контаминации РС МКС является смена экипажей, осуществление доставки с Земли заменяемого оборудования и расходных материалов, а также использование систем, обеспечивающих регенерацию продуктов жизнедеятельности людей на орбите. Большинство микроорганизмов, обнаруженных на борту РС МКС, связаны с человеком, а микробиом РС МКС напоминает микробиом некоторых замкнутых помещений на Земле [4–5] и может содержать условно-патогенные микроорганизмы [2, 6, 7]. Некоторые виды бактерий могут приводить к воз-

никновению инфекций. Особенную опасность представляют спорообразующие бактерии, в частности — представители рода *Bacillus*, которые могут долгое время выживать в окружающей среде при низком содержании влаги и питательных веществ [8]. Постоянное наблюдение за микробиомом на РС МКС позволяет оценить факторы риска для здоровья экипажа, целостности МКС и функционирования ее систем. Так, Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства США (НАСА) определило, что исследование микробиома Международной космической станции (МКС) является основной целью текущих и будущих исследований на орбите [1].

Целью настоящей работы было изучение устойчивости штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб, доставленных из РС МКС, к ряду клинически значимых антибиотиков и определение возможных механизмов этой устойчивости.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии рода *Bacillus* — *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, выделенные из образцов, доставленных из РС МКС в 2012–2014 гг. и идентифицированные до вида с применением молекулярных методов [3], а также бактерии, выделенные и идентифицированные нами в настоящей работе из образцов, доставленных из РС МКС в 2018 г. Для сравнительного изучения были использованы штаммы трех видов бактерий рода *Bacillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ: *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. pumilus* КМ-МГУ 364 и *B. subtilis* КМ-МГУ 25.

Идентификацию бактерий, выделенных в 2018 г., осуществляли путем анализа генов 16S рРНК [9]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясо-пептонным бульоном (МПБ) с 1% глюкозы, проводили с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit КО 512 (Thermo Scientific, США) по методике, рекомендуемой разработчиками этого комплекта реактивов. 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'). Полученные фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле с помощью электрофореза (120 В). Агарозный гель готовили, добавляя агарозу (1–1,2%) в 1х трис-ацетатный (ТАЕ) буфер, нагревали до 90–95°C, перемешивали до полного растворения агарозы, добавляли 7,5 мкл раствора бромистого этидия на каждые 150 мл раствора, охлаждали до 45–50°C и заливали в специальную форму. После полимеризации гель переносили в электрофорезную горизонтальную ка-

меру Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США). В образцы с фрагментами ДНК добавляли буфер в объеме 1:5. Электрофоретическое разделение проводили в буфере 1х ТАЕ. Фрагменты нуклеиновых кислот определяли в УФ-свете. 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).

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 аминоциклитольный антибиотик спектиномицин. Рост бактерий оценивали, добавляя в лунки резазурин (Sigma, США) до концентрации 50 мкМ [10].

Для оценки активности эффлюкс-систем в 96-луночный планшет 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 и лунки, содержащие только питательную среду с культурой и СССР. Планшеты инкубировали в течение суток при 37°C. О влиянии СССР на рост судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ [10]. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Активность эффлюкса определяли 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 [11].

Результаты и обсуждение

Идентификация культур. В ходе настоящей работы были использованы штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные ранее и идентифицированные до вида [3], а также новые штаммы спорообразующих бактерий, выделенных из проб, полу-

ченных из РС МКС и идентифицированных нами уже в ходе настоящей работы. Все четыре новых исследованных штамма на основании анализа последовательностей 16S рПНК были отнесены к роду *Bacillus* и обозначены как штаммы PWN2D, DLA64, LR2HG21 и НЕР3В2. Так как последовательности гена 16S рПНК исследуемых штаммов оказались одновременно близки к нескольким видам рода *Bacillus*, то их не удалось однозначно отнести к конкретному виду.

Определение МИК. Изучена устойчивость штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных из РС МКС, к ряду клинически значимых антибиотиков, действующих на грамположительные бактерии. В качестве культур для сравнения исследовались некоторые штаммы бацилл, полученные из музея кафедры микробиологии МГУ. Проанализирована устойчивость исследуемых штаммов к таким β-лактамным антибиотикам, как пенициллин, ампициллин, меропенем, производным цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуроксим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим) и IV-го (цефепим) поколений, а также аминоциклитольному антибиотику спектиномицину (табл. 1). Благодаря высокой эффективности действия, низкой токсичности и наличию разработанных технологий получения β-лактамы антибиотики нашли наиболее широкое применение в современной медицине. Спектиномицин является единственным в ряду использованных нами антибиотиков, не относящийся к β-лактамам. Его часто назначают в качестве резервного препарата для пациентов, которых нельзя лечить цефалоспориновыми третьего и четвертого поколений.

Штамм *B. licheniformis* 7-12, выделенный из РС МКС, показал очень высокую устойчивость к пенициллину, ампициллину и цефтриаксону — 1024 мкг/мл (табл. 1). Высокая резистентность была обнаружена у этого штамма также ко всем другим изученным антибиотикам. Штамм *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 из коллекции кафедры микробиологии МГУ показал наличие устойчиво-

сти только к пенициллину, ампициллину и спектиномицину с МИК 128, 256 и 256 мкг/мл соответственно.

Штамм *B. pumilus* 8-12 также показал очень высокую устойчивость ко всем исследуемым антибиотикам, причем особенно высокие значения были получены при использовании ампициллина и цефтазида — МИК 2048 мкг/мл (табл. 1). Высокая резистентность показана также к цефоперазону и цефепиму с МИК 1024 мкг/мл. Наиболее эффективными ингибиторами показали себя цефуроксим и цефтриаксон с МИК 64 и 128 мкг/мл, являющиеся цефалоспориновыми II-го и III-го поколения, и меропенем с МИК 16 мкг/мл (табл. 1). Штамм *B. pumilus* КМ-МГУ 364, подобно *B. pumilus* 8-12, показал высокую устойчивость в отношении цефтазида и цефепима — 1024 и 512 мкг/мл соответственно, но, по сравнению со штаммом 8-12, устойчивость штамма КМ-МГУ 364 была ниже ко всем исследованным антибиотикам, особенно к пенициллину, ампициллину и цефоперазону (табл. 1). Штамм *B. subtilis* 14-12 показал значительную устойчивость только к четырем исследуемым антибиотикам — пенициллину, ампициллину, цефуроксиму и спектиномицину — со значениями МИК 2048, 2048, 16 и 32 мкг/мл соответственно (табл. 1). Устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда, причем практически всех поколений, у *B. subtilis* 14-12 была низкой. Штамм *B. subtilis* КМ-МГУ 25 показал сходную с *B. subtilis* 14-12 картину резистентности (табл. 1) за исключением более высокой устойчивости к спектиномицину, МИК которого составила 2048 мкг/мл.

Из четырех выделенных и идентифицированных в ходе данной работы штаммов бактерий рода *Bacillus* максимальные значения МИК для изученных антибиотиков показал штамм *Bacillus* sp. НЕР3В2 (табл. 1). Штамм был устойчив ко всем исследуемым антибиотикам, причем не только к пенициллину и ампициллину, но и к цефалоспориновым I-го и III-го поколений — цефазолину и цефтриаксону, а также меропенему с уровнем

Таблица 1

Минимальная ингибирующая концентрация антибиотиков (мкг/мл) у штаммов бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Пенициллин	Ампициллин	Цефазолин	Цефуроксим	Цефтриаксон	Цефоперазон	Цефтазидим	Цефепим	Меропенем	Спектиномицин
<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. 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>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	1024	512	1024	128	1024	16	128	128	1024	256
<i>Bacillus</i> sp. PWN2D	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>Bacillus</i> sp. DLA64	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	512	2048	2	1024	16	16	512	64	1024	512

Примечание: «—» — минимальную ингибирующую концентрацию для этих антибиотиков не определяли

МИК 1024 мкг/мл (табл. 1). Штаммы *Bacillus* sp. PWN2D и *Bacillus* sp. DLA64 показали одинаковые значения МИК ко всем исследуемым антибиотикам (табл. 1). Оба штамма были устойчивы к пенициллину, ампициллину и спектиномицину со значением МИК 256 мкг/мл. У штамма *Bacillus* sp. LR2HG21 максимальная резистентность обнаружена к ампициллину со значением МИК 2048 мкг/мл. Значение МИК для цефуроксима и меропенема составляло 1024 мкг/мл, а для пенициллина, спектиномицина и цефалоспоринового антибиотика цефтазида — по 512 мкг/мл (табл. 1).

Следует отметить, что в данной работе определение МИК выполняли с использованием методов последовательных разведений в микропланшете, а большинство экспериментов по определению значения МИК в отношении бактерий рода *Bacillus* выполнены методом градиентной диффузии, поэтому прямое сравнение полученных результатов с литературными данными было бы некорректно, хотя в ряде работ была отмечена устойчивость штаммов рода *Bacillus* к пенициллину и некоторым другим антибиотикам [2].

Определение наличия эффлюкса. Основным параметром, определяющим эффективность антимикробных препаратов по отношению к штамму микроорганизма, является величина МИК антибиотика, которая может определяться, в том числе, и наличием у клеток активных насосов, откачивающих антибиотик из клетки и функционирующих за счет электрохимического потенциала мембраны [12]. Вклад системы эффлюкса в устойчивость исследуемых нами штаммов была оценена путем измерения значения МИК для

антибиотиков до и после воздействия ингибитора эффлюксного насоса СССР. Было показано, что внесение СССР в питательную среду без антибиотиков не приводило к подавлению роста культур. Добавление СССР к засеянной в питательную среду культуре в присутствии антибиотика приводит к беспрепятственному накоплению этого антибиотика в клетке и, следовательно, к снижению МИК у бактерий, которые обладают активными откачивающими насосами.

Все изучаемые нами штаммы бактерий показали высокую устойчивость к действию пенициллина и ампициллина (табл. 1). Наличие эффлюкс-насосов, активных в отношении этих антибиотиков, исследовали у *B. licheniformis* 7-12, *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 (табл. 2). Установлено, что у *B. licheniformis* 7-12 и *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 в присутствии пенициллина или ампициллина механизм эффлюкса отсутствует. Это свидетельствует о том, что у этих штаммов устойчивость к исследованным антибиотикам обусловлена, видимо, только активностью β -лактамазы, разрушающей антибиотик. В то же время у штаммов *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 в присутствии пенициллина или ампициллина отмечена очень высокая активность эффлюкса (табл. 2).

Кроме пенициллина и ампициллина для изучения эффлюкса у *B. licheniformis* 7-12 были отобраны цефтазидим как цефалоспориновый антибиотик III-го поколения, к которому уровень устойчивости бактерий еще относительно низкий (значение МИК 128 мкг/мл), а механизм этой устойчивости видимо только начал формировать-

Таблица 2

Значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков и активность эффлюкс-насосов у штаммов бактерий рода *Bacillus* для пенициллина, ампициллина, некоторых 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>Bacillus</i> sp. R2HG21	Пенициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. R2HG21	Ампициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Пенициллин	1024	2	512	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. 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>Bacillus</i> sp. LR2HG21	Цефепим	64	16	4	Умеренная
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	Спектиномицин	512	32	16	Умеренная
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Цефепим	128	2	64	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Спектиномицин	256	2	128	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. PWN2D	Спектиномицин	256	8	32	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. DLA64	Спектиномицин	256	2	128	Высокая

ся, и спектиномицин как антибиотик, заведомо не подверженный действию β -лактамазы и к которому *B. licheniformis* 7-12 проявил высокую устойчивость с МИК 512 мкг/мл. В присутствии цефтазида или спектомицина у *B. licheniformis* 7-12 проявлялась умеренная активность эффлюкса.

Для определения наличия эффлюкс-насосов у *B. pumilus* 8-12 были отобраны цефалоспорины III-го и IV-го поколений цефтриаксон и цефепим со значениями МИК 128 и 1024 мкг/мл соответственно (табл. 2). Значения МИК этих антибиотиков в присутствии СССР указывают на умеренную активность эффлюкс-насосов (табл. 2).

Наличие эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus* sp. LR2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 изучали с применением цефепима и спектиномицина, а у штаммов PWN2D и DLA64 только с использованием спектиномицина. Цефепим был взят как цефалоспорин IV-го поколения, представляющий наибольший интерес ввиду его новизны, а спектиномицин использовался как антибиотик, заведомо не разрушающийся β -лактамазой. У *Bacillus* sp. LR2HG21 выявлена умеренная, а у *Bacillus* sp. НЕР3В2 высокая активность эффлюкс-насосов в отношении как цефепима, так и спектиномицина (табл. 2). У двух штаммов бацилл — PWN2D и DLA64 — была обнаружена высокая активность эффлюксных насосов в отношении спектиномицина (табл. 2).

В результате многолетнего изучения микробиома МКС было установлено, что среди бактерий доминировали по частоте обнаружения виды рода *Staphylococcus*, а на втором месте были бактерии рода *Bacillus* [3, 13]. И если преобладание стафилококков можно объяснить их связью с человеком [4, 5], то высокая встречаемость представителей рода *Bacillus* связана с их чрезвычайно высокой устойчивостью к высушиванию и недостатку питательных веществ [14]. Бактерии рода *Bacillus* встречаются повсеместно, число их видов уже превышает 200. Однако на МКС видовое разнообразие изученных бацилл составляет не более двух десятков видов, и доминируют *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*. [2, 3, 13]. Исторически *B. anthracis* был признан единственным патогенным видом рода, однако некоторые штаммы *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. alvei* были описаны как оппортунистические и даже патогенные [8].

Штаммы *B. licheniformis* 7-12 и *B. pumilus* 8-12 продемонстрировали намного более высокую устойчивость к пенициллину и ампициллину, чем штаммы *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 и *B. pumilus* КМ-МГУ 364, взятые для сравнительного анализа из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Многие штаммы бацилл, выделенных с РС МКС, проявили высокую устойчивость к цефалоспорином I-IV поколений и меропенему (табл. 1). В то же время все штаммы, взятые из коллекции

МГУ — *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. pumilus* КМ-МГУ 364, *B. subtilis* КМ-МГУ 25, а также некоторые «космические» штаммы бацилл — *Bacillus* sp. PWN2D и *Bacillus* sp. DLA64 — показали очень низкую устойчивость к цефалоспорином поколений I-IV и меропенему (табл. 1). И если низкую устойчивость коллекционных культур можно объяснить их многолетним хранением в коллекции, в результате чего устойчивость к антибиотикам у них не успела сформироваться, то причины и механизмы резистентности к антибиотикам у «космических» штаммов могут быть различными.

Первой предполагаемой причиной появления в космосе штаммов бацилл, устойчивых к ряду антибиотиков, могут быть, прежде всего, мутации, вызванные предполетной стерилизацией оборудования и приборов с помощью УФ-облучения, перекиси водорода или других дезинфектантов, а также мутации, обусловленные воздействием специфических условий космоса — космическим излучением и микрогравитацией. Не исключено попадание на МКС устойчивых штаммов бацилл и с космонавтами, поскольку эти бактерии являются частью микробиоты человеческой кожи и кишечника [15]. В любом случае клинически значимая устойчивость к противомикробным препаратам появившихся на МКС штаммов может распространяться путем горизонтального переноса генов — например, с помощью плазмид [13, 16]. Так, у большинства из 40 штаммов бацилл, выделенных из проб исследовательской станции в Антарктике и МКС, обнаружили одну или две плазмиды, некоторые из которых были связаны с репликационными элементами вирулентности *B. anthracis* rXO1 и rXO2. Кроме того, было установлено, что шесть из 25 протестированных штаммов приобрели чужеродную ДНК путем конъюгации [13, 16]. Как уже говорилось, доминирующим родом бактерий на МКС является *Staphylococcus*. Известно также, что стафилококки оказались первыми микроорганизмами, среди которых широкое распространение получила устойчивость к β -лактамам антибиотикам, что привело к существенному снижению эффективности традиционной терапии [17]. Вероятно, исследуемые нами бациллы могли приобрести β -лактамазную устойчивость от стафилококков, что привело к повышению их устойчивости к антибиотикам.

И наконец, исследованные нами штаммы бацилл могли приобрести один из механизмов защиты от антибиотиков, среди которых — модификация мишени действия антибиотика, его инактивация, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки. Все эти механизмы способны функционировать как по отдельности, так и в комплексе. Мы исследовали возможность функционирования у наших штаммов эффлюкса. Этот механизм возник в ходе

эволюции для защиты от веществ, ингибирующих метаболизм микроорганизма.

Полученные данные указывают на отсутствие у *B. licheniformis* 7-12 и *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, показывающих высокие значения МИК к пенициллину и ампициллину, активных эффлюкс-систем (табл. 2). Высокая устойчивость к данным антибиотикам у этих штаммов, по-видимому, связана с инактивацией их β -лактамазами. В то же время у выделенных из проб МКС штаммов *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 в присутствии пенициллина или ампициллина отмечена очень высокая активность эффлюкса. Следовательно, механизм устойчивости к пенициллину или ампициллину у разных штаммов бацилл может различаться.

В присутствии цефтазидима, цефтриаксона, цефепима и спектиномицина у *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12 и *Bacillus* sp. LR2HG21 обнаружена умеренная активность эффлюкс-насосов (табл. 2), что позволяет предположить присутствие у этих штаммов дополнительных к эффлюкс-системам механизмов устойчивости — например, β -лактамазной активности. Установленная нами высокая активность эффлюксных насосов у штамма НЕР3В2 по отношению к цефепиму и спектиномицину, а у штаммов PWN2D и DLA64 — к спектиномицину позволяет считать, что у этих штаммов основным механизмом устойчивости к исследованным антибиотикам является эффлюкс (табл. 2).

Эффлюкс-насосы встречаются практически у всех видов бактерий, гены, кодирующие этот класс белков, могут быть расположены на хромосомах или плазмидах и передаваться путем горизонтального переноса [18, 19]. Эффлюксные насосы можно разделить на две группы: первичные и второстепенные транспортеры. Семейство транспортеров ABC относится к первой группе. Для функционирования эти транспортеры используют энергию гидролиза АТФ. Второстепенные транспортеры включают семейства MFS, SMR, RND, MATE и функционируют за счет электрохимического потенциала мембраны

[17, 20]. Одним из самых распространенных способов подавления эффлюкс-насосов, относящихся к второстепенным транспортерам, является применение СССР. Этот разобщитель процесса окислительного фосфорилирования нарушает протонный градиент мембран, необходимый для активности эффлюкс-насосов [12, 21, 22].

Активность эффлюкс-насосов может меняться за счет возникновения различных мутаций, которые в некоторых случаях приводят к повышению эффективности выброса антибиотика из клетки [22]. Для грамположительных бактерий клинически значимыми эффлюксными насосами, определяющими устойчивость к широкому спектру антибиотиков, являются транспортеры, входящие в семейство MFS [18]. Лучше всего структура эффлюкс-насосов среди грамположительных бактерий изучена у *B. subtilis*. У них обнаружены транспортеры, относящиеся к семействам MFS и SMR [18, 21, 23, 24]. Основываясь на данных литературы и действию СССР в отношении исследуемых штаммов (табл. 2), можно полагать, что обнаруженные нами системы активного оттока антибиотиков у штаммов бацилл относятся к группе второстепенных транспортеров семейств MFS или SMR, описанных для рода *Bacillus* [12, 18, 21, 23, 24].

До сих пор не сообщалось о серьезных инфекциях или вспышках болезней на МКС [25]. Однако обнаруженные штаммы бактерий, обладающие высокой устойчивостью в отношении некоторых антибиотиков, требуют дальнейшего скрининга микробиоты МКС для своевременного предупреждения возможных потенциальных рисков, которые могут представлять некоторые из этих микроорганизмов для здоровья людей с ослабленным иммунитетом — например, космонавтов — в результате их работы в экстремальных условиях длительного космического полета.

Работа финансировалась за счет собственных средств авторов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mora M., Mahnert A., Koskinen K., Pausan M.R., Oberauer-Wappis L., Krause R., Perras A.K., Gorkiewicz G., Berg G., Moissl-Eichinger C. Microorganisms in confined habitats: microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the International Space Station // Front Microbiol. 2016. Vol. 7: 1573.
2. Mora M., Perras A., Alekhova T., Wink L., Krause R., Aleksandrova A., Novozhilova T., Moissl-Eichinger C. Resilient microorganisms in dust samples of the International Space Station-survival of the adaptation specialists // Microbiome. 2016. Vol. 4. N 1. P. 65–85.
3. 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. Vol. 465. N 1. P. 104–107.
4. Coil D.A., Neches R.Y., Lang J.M., Brown W.E., Severance M., Cavalier D.D., Eisen J.A. Growth of 48 built environment bacterial isolates on board the International Space Station (ISS) // Peer J. 2016. Vol. 4: e1842.
5. Moissl-Eichinger C., Cockell C., Rettberg P. Venturing into new realms? Microorganisms in space // FEMS Microbiol. Rev. 2016. Vol. 40. N 5. P. 722–737.
6. 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. Vol. 3. N 1. P. 50–68.

7. Vaishampayan K.P., Cisneros J., Pierson D.L., Rogers S.O., Perry J. International Space Station environmental microbiome-microbial inventories of ISS filter debris // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. N 14. P. 6453–6466.

8. Farrar W.E., Rebolli A.C. The genus *Bacillus*—Medical // *The Prokaryotes. Handbook on the biology of bacteria*, vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. P. 609–630.

9. Janda J.M., Abbot S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45. N 9. P. 2761–2764.

10. Elshikh M., Ahmed S., Funston S., Dunlop P., McGaw M., Marchant R., Banat I.M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38. N 6. P. 1015–1019.

11. Ardebili A., Lari A.R., Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // *Ann. Lab. Med.* 2014. Vol. 34. N 6. P. 433–438.

12. Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria // *Drugs*. 2004. Vol. 64. N 2. P. 159–204.

13. Timmerly S., Hu X., Mahillon J. Characterization of *Bacilli* isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the International Space Station // *Astrobiology*. 2011. Vol. 11. N 4. P. 323–334.

14. Horneck G., Moeller R., Cadet J., Douki T., Rocco L., Mancinelli R.L., Wayne L., Nicholson W.L., Panitz C., Rabbow E., Rettberg P., Spry A., Stackebrandt E., Vaishampayan P., Venkateswaran K.J. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes – Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // *Astrobiology*. 2012. Vol. 12. N 5. P. 445–456.

15. Gaci N., Borrel G., Tottey W., O'Toole P.W., Brugère J-F. Archaea and the human gut: new beginning of an old story // *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20. N 43. P. 16062–16078.

16. Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer // *Science*. 2019. Vol. 364. N 6442. P. 778–782.

17. Foster T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. Vol. 41. N 3. P. 430–449.

18. Piddock L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. Vol. 4. N 8. P. 629–636.

19. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms // *Ann. Med.* 2007. Vol. 39. N 3. P. 162–176.

20. Blair J.M.A., Richmond G.E., Piddock L.J.V. Multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance // *Future Microbiol.* 2014. Vol. 9. N 10. P. 1165–1177.

21. Peleg A.Y., Adams J., Paterson D.L. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51. N 6. P. 2065–2069.

22. Baranova N., Elkins C.A. Antimicrobial drug efflux pumps in other gram-positive bacteria // *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, regulation and clinical implications* / Eds. X. Li, C.A. Elkins, and H.I. Zgurskaya. Cham: Springer, 2018. P. 197–218.

23. Maseoka Y., Ueno Y., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. N 8. P. 2307–2310.

24. Zhang Z.C., Pornillos M.O., Chang X.G., Saier M.H. Functional characterization of the heterooligomeric EbrAB multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. N 17. P. 5218–5225.

25. Van Houdt R., Mijndonckx K., Leys N. Microbial contamination monitoring and control during human space missions // *Planet Space Sci.* 2012. Vol. 60. N 1. P. 115–120.

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята в печать 15.10.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station

R.R. Yenikeev* , N.Y. Tatarinova , L.M. Zakharchuk 

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

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

The Russian segment of the International Space Station, as a closed habitat, is a favorable environment for the development of microorganisms. There are bacteria and fungi of various systematic groups, some of which can lead to infections. Thus, certain species of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* are dangerous. In seven strains of bacteria of this genus,

isolated from samples obtained at the station, resistance to such β -lactam antibiotics as penicillin, ampicillin, meropenem, a number of cephalosporin derivatives I (cefazolin), II (cefuroxime), III (ceftriaxone, cefoperazone, ceftazidime), IV (cefepime) generations, as well as the aminocyclitol antibiotic spectinomycin. It was found that all these strains are resistant to penicillin and ampicillin with a minimum inhibitory concentration (MIC) from 16 to 2048 $\mu\text{g/ml}$, as well as to cephalosporin antibiotics and meropenem with a MIC value from 2 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial resistance to spectinomycin used in patients with allergy to β -lactams penicillins and cephalosporins is in the MIC range from 32 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. The absence of active efflux pumps in *B. licheniformis* 7-12 with high MIC values for penicillin and ampicillin suggested that this strain has a β -lactamase defense mechanism against these antibiotics. In three more strains resistant to penicillin and ampicillin – *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21, *Bacillus* sp. HEP3B2 functions another defense mechanism – active transport of the antibiotic from the cell, mediated by the presence of efflux pumps, functioning due to the electrochemical potential of the cell membrane. It has been shown that, in six strains of the studied bacilli, resistance to cephalosporin derivatives of the 3rd-4th generations of ceftriaxone, ceftazidime, cefepime and the aminocyclitol antibiotic spectinomycin is also apparently provided by systems of active outflow of xenobiotics belonging to the group of secondary transporters.

Keywords: *Russian Segment of the International Space Station (ISS RS), bacteria of the genus Bacillus, antibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, efflux pumps, closed habitat*

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: <http://orcid.org/0000-0002-8467-9051>

Татаринова Наталья Юрьевна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: nata.tatarinova53@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9883-5780>

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