



АНИСИМОВА ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСЕЕВНА

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ:
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ И
ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ
В КИШЕЧНОМ МИКРОБИОМЕ**

03.02.03 – Микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2021

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: **Яруллина Дина Рашидовна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ИФМиБ К(П)ФУ

Официальные оппоненты: **Соловьева Ирина Владленовна**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией микробиома человека и средств его коррекции ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Нижний Новгород)

Каримов Ильшат Файзелгаянович, кандидат биологических наук, биолог научно-инновационного центра координации исследований, доцент кафедры микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (г. Оренбург)

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) (г. Москва)

Защита диссертации состоится «3» июня 2021 года в 14.00 на заседании диссертационного совета КФУ.03.07. при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <https://kpfu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

О. А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Антибиотикотерапия является основным современным средством борьбы с инфекциями. Однако необоснованное и чрезмерное использование антибиотических препаратов в клинической практике и животноводстве привело к широкому распространению антибиотикорезистентности среди микроорганизмов и сейчас представляет глобальную угрозу для здоровья населения. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, при сегодняшних темпах распространения устойчивости к 2050 году наступит «постантибиотическая эра», и ежегодно 10 миллионов человек будут умирать от инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами [WHO, 2019].

Проблема антибиотикорезистентности касается не только патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Комменсальные бактерии гастроинтестинальной микробиоты человека и животных также являются резервуаром и источником распространения генетических детерминант антибиотикорезистентности [Klein *et al.*, 2000; Snyderman, 2008]. Особыми возможностями для распространения антибиотикорезистентности обладают повсеместно встречающиеся, убиквитарные бактерии, такие как лактобациллы.

Лактобациллы широко распространены в природных экосистемах. У человека они входят в состав резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также колонизируют верхние отделы респираторного тракта и урогенитальный тракт у женщин [Dicks and Botes, 2010; Lim *et al.*, 2009]. Лактобациллы широко используются в производстве ферментированных пищевых продуктов и в пробиотикотерапии [Bernardeau *et al.*, 2008]. Пробиотические штаммы лактобацилл применяются для профилактики и лечения дисбактериозов различной этиологии, воспалительных заболеваний кишечника [Андреева, 2006], острой и антибиотикоассоциированной диареи [Wong *et al.*, 2015], в том числе обусловленной *Clostridioides difficile* [Pillai and Nelson, 2008]. Показана эффективность применения лактобацилл для борьбы с атопическим дерматитом у детей и урогенитальными инфекциями у женщин [Андреева, 2006].

Антибиотикорезистентность у лактобацилл бывает двух видов: врожденная (природная) и приобретенная (возникшая в результате мутаций и горизонтального транспорта генов). Лактобациллы обладают природной устойчивостью к аминогликозидам, ципрофлоксацину, ванкомицину и цефалоспорином [Sharma *et al.*, 2014]. Такая устойчивость связана с особенностями строения клетки лактобацилл и/или кодируется хромосомными генами, которые, как правило, не могут передаваться другим бактериям. Природная устойчивость лактобацилл к антибиотикам считается полезным пробиотическим свойством. Только устойчивые к антибактериальным препаратам бактерии можно совмещать с антимикробной терапией при лечении кишечных инфекций или применять для профилактики антибиотикоассоциированной диареи. Второй вид устойчивости обычно возникает в результате горизонтального транспорта генов, локализованных на мобильных генетических элементах. Так, у некоторых лактобацилл, выделенных из пищевых продуктов и пробиотиков, обнаружены приобретенные гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину, способные к горизонтальному транспорту *in vitro* и *in vivo* [Feld *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2008; Devirgiliis *et al.*, 2009]. Экспериментально доказана передача гена устойчивости к тетрациклину *tetM* от лактобацилл к *Enterococcus faecalis* [Feld *et al.*, 2008, Ouoba *et al.*, 2008;

Devirgiliis *et al.*, 2009] и *Lactococcus lactis* [Gevers *et al.*, 2003b]. Систематическое потребление в пищу бактерий, несущих в своем геноме потенциально мобильные гены антибиотикорезистентности, представляет угрозу создания пула таких генов в ЖКТ и последующей передачи патогенным микроорганизмам [Mathur *et al.*, 2005].

Таким образом, во избежание распространения лактобациллярных генов устойчивости к антибиотикам важно не допустить включение в пробиотики и продукты питания штаммов с потенциально мобильными генами антибиотикорезистентности [Bernardeau *et al.*, 2008].

В соответствии с вышеизложенным, **целью** работы явилось выяснение вклада лактобацилл в распространение и передачу генетических детерминант устойчивости к антибиотикам.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Создать коллекцию штаммов лактобацилл – изолятов из кисломолочных продуктов, растительного материала, фекалий человека и пробиотиков;
- 2) Охарактеризовать фенотип чувствительности лактобацилл к антибактериальным препаратам различных классов;
- 3) Выявить у лактобацилл генетические детерминанты устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам, β -лактамам, макролидам, хлорамфениколу, ванкомицину и тетрациклину;
- 4) Оценить *in vitro* и *in vivo* возможность горизонтального транспорта генов антибиотикорезистентности от лактобацилл к другим бактериям.

Научная новизна полученных результатов

На фенотипическом и генотипическом уровнях охарактеризованы профили антибиотикорезистентности лактобацилл, выделенных нами из растительного материала, ЖКТ человека, кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов. Обнаружено, что вне зависимости от источника выделения, большинство лактобацилл демонстрируют типичный профиль устойчивости к антибиотикам. Все штаммы лактобацилл, за исключением двух пробиотических изолятов, характеризуются множественной устойчивостью к антибиотикам, но их резистентность в основном является природной.

В геномах лактобацилл с помощью ПЦР и секвенирования ее продуктов выявлены гены устойчивости к ванкомицину (*vanX*), фторхинолонам (*parC*), аминогликозидам (*aadA*, *aadE*), макролидам (*ermB*, *ermC*, *mefA*) и тетрациклинам (*tetM*, *tetK*, *tetL*). Ген *ermC* у вида *L. fermentum* детектирован впервые. Гены β -лактамаз *blaTEM*, *blaOXA-1* и *blaSHV* впервые обнаружены у лактобацилл, не ассоциированных с оппортунистическими инфекциями.

Описана передача плазмидного гена устойчивости к тетрациклину *tetK* от бактерий *L. fermentum* 5-1 клеткам *Citrobacter freundii* посредством трансформации. На белых мышах, которые получали с пищей бактерии *L. fermentum* 5-1, несущие плазмидный ген устойчивости к тетрациклину *tetM*, показано распространение этого гена среди представителей кишечного микробного сообщества. Таким образом, в работе впервые установлено, что лактобациллы могут передавать гены устойчивости к тетрациклину в ходе трансформации, а также бактериям естественной микробиоты ЖКТ мышей в условиях *in vivo*.

Достоверность результатов

Включенные в диссертационную работу результаты получены с использованием актуальных методов молекулярной биологии и микробиологии на

современном высокотехнологичном оборудовании. В работе представлены статистически достоверные результаты, для анализа которых использовали стандартный пакет MS Excel. Большая часть результатов диссертационного исследования опубликована в рецензируемых российских и зарубежных журналах, доложена на конференциях международного уровня.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты составляют фундаментальную и методическую базу, необходимую для современной оценки микробиологической безопасности новых пробиотических штаммов. Профили фенотипической устойчивости лактобацилл к клинически распространенным антибиотикам могут быть использованы для составления обоснованных тактических схем применения пробиотических лактобацилл при этиотропной антибактериальной терапии, а также для лечебной коррекции и профилактики дисбиотических состояний. Важное теоретическое значение имеют данные о генетических основах приобретенной устойчивости лактобацилл к тетрациклину и эритромицину. Приоритетным результатом исследования является обнаружение вклада лактобацилл в распространении антибиотикорезистентности – одной из основных проблем здравоохранения в мире. Показана передача генов устойчивости к тетрациклину от кисломолочного изолята *L. fermentum* 5-1 бактериям *Citrobacter freundii* в процессе трансформации и бактериям кишечной микробиоты мышей *in vivo*.

Важное методическое значение имеет обобщение разрозненных данных о диаметре зон подавления роста и пограничных значениях МПК антимикробных препаратов для лактобацилл из отечественных и зарубежных источников. В целом, использованный в работе комплексный подход к исследованию антибиотикорезистентности лактобацилл демонстрирует оптимальную стратегию оценки микробиологической безопасности промышленных штаммов.

Основные положения, выносимые на защиту

- Независимо от источника выделения, лактобациллы характеризуются множественной устойчивостью к антибиотикам. Большинство исследованных лактобацилл проявляют природную устойчивость к ванкомицину, аминогликозидам, фторхинолонам, цефалоспорином и чувствительность к карбапенемам, пенициллинам, макролидам, линезолиду, хлорамфениколу, тетрациклину, клиндамицину, рифампицину.

- У лактобацилл распространен ген β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС) *bla*TEM и встречаются гены *bla*SHV и *bla*OXA-1.

- У лактобацилл обнаружены потенциально мобильные гены устойчивости к тетрациклину (*tet*M, *tet*K и *tet*L) и к макролидам (*erm*B, *erm*C и *me*fA).

- Установлено, что бактерии *Lactobacillus fermentum* 5-1 могут передавать ген устойчивости к тетрациклину *tet*K бактериям *Citrobacter freundii* в ходе трансформации, а также ген *tet*M – бактериям кишечной микробиоты мышей в условиях *in vivo*.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертационной работы представлены на ряде международных и российских конференций: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2015, 2016, 2019); Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015, 2016, 2018); Международная школа-

конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016, 2018); Международная научная конференция «Трансляционная медицина» (Казань, 2016); Научная конференция молодых ученых и специалистов с международным участием «Молодые ученые – медицине» (Владикавказ, 2016, 2017, 2018); Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА (Москва, 2016); Конференция молодых ученых РМАПО с международным участием «Шаг в завтра» (Москва, 2016); Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017, 2018, 2019, 2020); Всероссийская заочная научно-практическая конференция с международным участием «Микробиология в современной медицине» (Казань, 2017); Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017); Международный научно-практический конгресс «52nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «Precision medicine for healthy ageing» (Барселона, 2018); V Международная конференция «ПОСТГЕНОМ'2018» (Казань, 2018), Международная научная конференция «Kazan Precision Medicine Workshop» (Казань, 2018); II Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биохимия – основа наук о жизни» (Казань, 2018); VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, 2019); Международная научно-практическая конференция «Биотехнология микроорганизмов» (Минск, 2019); 2-ой Российский микробиологический научный конгресс (Саранск, 2019); VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020).

Место выполнения работы и личный вклад автора

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Диссертантом совместно с научным руководителем разработаны главные направления научного исследования, сформулирована цель, поставлены задачи исследовательской работы. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично диссертантом либо при его непосредственном участии. Автором лично проанализированы данные литературы, освоены методы работы, выполнены лабораторные эксперименты, проведены анализ и статистическая обработка полученных результатов, сформулированы выводы. Обсуждение и подготовка статей к публикации проводились совместно с научным руководителем.

Идентификация микроорганизмов методом масс-спектрометрии выполнена на базе Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ. Секвенирование ДНК выполнено сотрудниками Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ и в коммерческой фирме «Евроген». Эксперименты на животных выполнены на базе вивария кафедры физиологии человека и животных КФУ с участием сотрудников НИЛ «Нейробиология».

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 18-34-00268 мол_а «Анализ мобильности генов антибиотикорезистентности лактобацилл» (руководитель); РФФИ 18-415-160005 р_а «Синдром раздраженного кишечника: исследование механизмов формирования, вклада микробиоты и ее метаболитов и поиск новых подходов к лечению» (исполнитель); РФФИ КОМФИ 17-00-00456

«Антибактериальные пептиды лактобацилл в терапии микробных биопленок» (исполнитель).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 33 работы, в том числе 7 научных статей, среди них 3 статьи в отечественных рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 3 статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, заключения, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 154 страницах, проиллюстрирован 9 рисунками, включает 22 таблицы и 1 приложение, список литературы содержит 284 библиографических источника.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н., доценту кафедры микробиологии КФУ Яруллиной Д.Р. за поддержку и внимательное отношение к работе; д.б.н., доценту кафедры генетики КФУ Каюмову А.Р. за постоянные консультации и возможность проведения диссертационного исследования на базе НИЛ «Молекулярная генетика микроорганизмов»; к.б.н., с.н.с. НИЛ «Омиксные технологии» Григорьевой Т.В. за проведение идентификации микроорганизмов в Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ; к.б.н., в.н.с. ФБУН КНИ Института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора Куликову Н.С. за предоставленные штаммы микроорганизмов; к.б.н., доценту кафедры физиологии человека и животных КФУ Яковлевой О.В. за содействие в проведении экспериментов на лабораторных животных на базе вивария кафедры физиологии человека и животных КФУ. Также автор выражает признательность всем сотрудникам кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета и НИЛ «Молекулярная генетика микроорганизмов» за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили 68 штаммов лактобацилл, выделенных в ходе работы из фекалий человека (15 штаммов), кисломолочных продуктов (15 штаммов), растительного материала (19 штаммов) и пробиотических препаратов (19 штаммов). Также в работе использовали коллекционные штаммы: *L. rhamnosus* В-8238, *L. brevis* DSM 20054, *L. buchneri* DSM 20057 и *L. hilgardii* LMG 7934.

Выделение лактобацилл выполнено методами классической микробиологии на селективной среде MRS. Определение принадлежности к роду *Lactobacillus* проводили по ГОСТ 10444.11-89. Видовую принадлежность лактобацилл установили по спектру утилизируемых субстратов с использованием планшетных тест-систем «АНАЭРОтест-23» и «СТРЕПТОтест-24» («MicroLaTest», Чехия), а также с помощью молекулярно-биологических методов: секвенирование гена 16S рРНК и масс-спектрометрии на приборе MALDI BioTyper Microflex (Bruker Daltonics, Германия).

Для анализа полученных последовательностей генов 16S рРНК использовали программное обеспечение SequenceScanner v1.0 (Applied Biosystems), сборку консенсусных последовательностей ДНК (контигов) выполняли с помощью

DNA Baser v.4.36.0, таксономическую идентификацию бактерий проводили с помощью алгоритма BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), используя базу данных 16S рРНК последовательностей бактерий и архей.

В качестве потенциальных реципиентов генетических детерминант антибиотикорезистентности использовали грамотрицательные бактерии: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens* G (Институт медицинской микробиологии, г. Гиссен, Германия), *Serratia marcescens* N, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (ФБУН КНИИ «Институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, г. Казань), *Escherichia coli* (Кафедра микробиологии ИФМиБ КФУ, г. Казань); и грамположительные: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* TG, *Enterococcus faecalis* KG, *Listeria monocytogenes* 88K (кафедра микробиологии ИФМиБ КФУ, г. Казань).

Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Чувствительность лактобацилл к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 с некоторыми модификациями. В 20 мл стерильной агаризованной среды MRS, растопленной и остуженной до 45°C, вносили 1 мл суспензии лактобацилл с плотностью 1.5×10^8 КОЕ/мл, тщательно перемешивали, после чего наслаивали ровным слоем на чашки Петри. После застывания среды стерильным пинцетом раскладывали на поверхность агара диски с антибиотиками. Чашки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Чувствительность лактобацилл к антибиотикам оценивали по зонам задержки роста (мм) вокруг дисков [Melo *et al.*, 2017; Charteris *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2015].

МПК антимикробных препаратов определяли методом микроразведений. Готовили серии двукратных разведений исследуемых соединений с концентрациями 0.125–256 мкг/мл (или 0.5–1025 мкг/мл) и засекали бактериальной культурой до 3×10^7 КОЕ/мл.

Для определения чувствительности условно-патогенных микроорганизмов к эритромицину и тетрациклину («Sigma», Германия) использовали метод градиентного агара [Calton *et al.*, 1981].

Для всех исследованных штаммов лактобацилл рассчитывали индекс множественной лекарственной устойчивости (multi-antibiotic resistance, MAR), который равен отношению количества антибиотиков, к которым штамм проявляет устойчивость, к общему количеству исследованных антибиотиков. Считается, что бактерии обладают множественной лекарственной устойчивостью, если MAR индекс больше 0.2 [Furtula *et al.*, 2013].

Поиск и характеристика генетических детерминант устойчивости лактобацилл к антибиотикам

Выделение геномной ДНК проводили фенол-хлороформным методом [Sambrook *et al.*, 1989]. Плазмидную ДНК выделяли с помощью GenJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo Scientific» Литва). Анализ генетических детерминант выполнен методом ПЦР с праймерами к генам антибиотикорезистентности. ПЦР проводили с помощью термоциклера «C1000 Thermal Cycler» («Bio-Rad», США). ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле на основе 1×TAE-буфера, окрашенным Midori Green DNA Strain («Nippon Genetics Europe», Германия), с последующей визуализацией на «Gel Doc XR+» («Bio-Rad», США). Очистку ДНК из геля осуществляли с использованием набора реактивов «GeneJET

Gel Extraction Kit» («Thermo Scientific», Латвия). Секвенирование полученных фрагментов ДНК выполнено на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования (КФУ, г. Казань) и в коммерческой фирме «Евроген» (Москва). Полученные секвенированием первичные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием алгоритма BLASTn и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Горизонтальный транспорт генов антибиотикорезистентности лактобацилл в условиях *in vitro*

- Совместное культивирование лактобацилл и бактерий-реципиентов в условиях, имитирующих содержимое кишечника. Лактобациллы и клетки реципиентных бактерий, выращенные до стационарной стадии роста, отмывали от питательной среды центрифугированием и смешивали в соотношении 1:1 в буфере, имитирующем содержимое толстого кишечника человека (г/л: KCl – 0.2, NaCl – 8, K₂HPO₄ – 0.24, Na₂HPO₄ – 1.44, pH 7.0). Полученную суспензию клеток с плотностью 10⁹ КОЕ/мл инкубировали на качалке при 37 °C в течение 8 ч, после чего 500 мкл высевали поверхностно на LB-агар, содержащий 10 мг/мл тетрациклина/эритромицина и экспериментально отобранный нами селективный антибиотик. В контрольном варианте смесь бактерий высевали на чашки с LB-агаром и MRS-агаром без антибиотика. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 37 °C.

- «Конъюгация на мембране». Свежие среды MRS и LB инокулировали в соотношении 1:100 ночными культурами лактобацилл и реципиентных бактерий, соответственно, и инкубировали при 37°C в течение 4-5 ч до достижения середины экспоненциальной фазы роста. Равные объемы донорных и реципиентных бактерий смешивали и фильтровали через стерильный нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, США). После этого через фильтр пропускали стерильный физиологический солевой раствор пептона (PPS) (г/л: NaCl – 8.5; бактериологический пептон – 1). Фильтры инкубировали в течение ночи на LB-агаре при 37 °C, после чего смывали бактерии с мембран 2 мл PPS и высевали на двойной селективный LB-агар, содержащий 10 мг/мл тетрациклина/эритромицина и экспериментально отобранный нами селективный антибиотик. Донорные и реципиентные культуры также высевали на агар с антибиотиками в качестве контроля. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

- Трансформация бактерий методом электропорации. Компетентные клетки реципиентных бактерий были получены как описано ранее [Sambrook *et al.*, 1989]. Для проведения электропорации на льду в стерильную электропорационную кювету добавили 50 мкл компетентных клеток и 3 мкл плазмидой ДНК и поместили в прибор Bio-Rad MicroPulse. Использовали следующие параметры электропорации: напряжение 2.5 кВ и длительность импульса 5 мс. Затем в кюветы добавили по 1 мл среды LB и инкубировали с качанием 1 час при 37 °C. Бактерии (350 мкл) высевали поверхностно на LB с агаром с соответствующим антибиотиком и инкубировали 24 ч при 37° C.

Передача генов антибиотикорезистентности от лактобацилл *in vivo*

Животным экспериментальной группы (ЛБ) ежедневно в течение двух недель вводили перорально суспензии лактобацилл-доноров (*L. fermentum* 5-1, *L. plantarum* AG1, *L. paracasei* E1 и *L. plantarum* Act-2) в физрастворе в количестве 2 x 10⁸ КОЕ/кг животного. Также мыши имели свободный доступ к поилкам, содержащим физраствор с лактобациллами в концентрации 10⁷ КОЕ/мл. По

истечении двух недель, мышам семь дней вводили *per os* физраствор без лактобацилл. Животные контрольной группы (К) на протяжении 21 дня эксперимента получали физиологический раствор и питьевую воду. Отбор фекалий для анализа фенотипа и генотипа антибиотикорезистентности осуществляли в первый день эксперимента – для оценки входных параметров, а также на 7, 14 и 21 день эксперимента. Исследование выполнено в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU для экспериментов на животных и одобрено Локальным этическим комитетом КФУ (протокол №8 от 5.05.2015).

Изменение антибиотикорезистентности микробиоты под влиянием интродукции лактобацилл оценивали по значению МПК антибиотиков для культивируемой части микробиоты фекалий, полученных от исследуемых мышей в 1, 7, 14 и 21 день эксперимента. Для характеристики резистомы в этих образцах фекалий методом ПЦР и ПЦР-РВ определяли содержание генов устойчивости к антибиотикам.

Общую ДНК из фекалий мышей выделяли набором QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit Print («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию ДНК проводили с помощью прибора Real-Time CFX96 Touch («Bio-Rad», США). Сбор данных и математический анализ результатов ПЦР-РВ проводили с использованием программного обеспечения CFX Manager™ Software Version 2.0. («Bio-Rad», США) и Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Относительную копийность гена (RQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta C_t}$, где $\Delta C_t = C_t$ (пороговый цикл ПЦР-реакции с ДНК, выделенной на 7, 15 и 21 день эксперимента) – C_t (исходный пороговый цикл ПЦР-РВ). За исходный C_t приняли значение порогового цикла ПЦР-РВ с ДНК, выделенной в первый день эксперимента.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе «Microsoft Excel». Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Видовая идентификация лактобацилл

В данной работе из кисломолочных продуктов, растительного материала, пробиотических препаратов и фекалий человека выделено 68 штаммов лактобацилл. Выделенные бактерии окрашивались по Граму положительно, спор не образовывали и не обладали каталазной активностью – это позволило отнести их к роду *Lactobacillus*.

Анализ спектра утилизируемых субстратов относится к традиционной схеме идентификации бактерий, учитывающей морфологические, физиологические и биохимические характеристики организмов. Для 20 штаммов лактобацилл определили спектр утилизируемых субстратов: сахаров, многоатомных спиртов и глюкозидов. Только для шести из 20 исследованных штаммов лактобацилл спектр утилизируемых субстратов полностью совпадал с данными Определителя Берджи. Видовую идентификацию оставшихся 14 штаммов данным методом осуществить не удалось. Поэтому мы заключаем, что достоверная идентификация лактобацилл не может основываться исключительно на данных о ферментации углеводов.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S РНК является «золотым стандартом» для видовой идентификации бактерий и успешно используется для

классификации и идентификации лактобацилл. В данной работе этот метод применили для идентификации 26 штаммов лактобацилл. В результате для 23 штаммов процент сходства последовательности гена 16S рНК с последовательностями из базы данных NCBI составил 99-100%, для двух штаммов – 98% и для одного – 97%. Идентификация считается достоверной, если указанный процент сходства превышает 98.65% [Kim *et al.*, 2014]. Таким образом, с помощью анализа последовательности гена 16S рНК мы успешно выполнили идентификацию 23 исследуемых штаммов лактобацилл.

В последнее время как высоконадежный способ идентификации микроорганизмов зарекомендовала себя MALDI-TOF MS. Среди преимуществ MALDI Biotyper идентификации – высокая чувствительность, несложная пробоподготовка и быстрота проведения. В данной работе MALDI-TOF MS применили для идентификации 66 штаммов лактобацилл, в том числе 20, для которых вид был установлен по последовательности гена 16S рНК. Результаты идентификации данным методом на 100% совпали с результатами идентификации по гену 16S рНК. Тем не менее, только для 15 исследованных лактобацилл полученный логарифмический показатель MALDI Biotyper превысил значение 2.3, следовательно, позволил достоверно определить вид. Для остальных штаммов вид установлен предположительно.

Таким образом, с помощью полифазного подхода, интегрирующего разные методы идентификации бактерий, в работе установили принадлежность к виду *L. fermentum* у 11 исследуемых штаммов лактобацилл, к виду *L. plantarum* – у 17 штаммов, к виду *L. paracasei* – у трех и к виду *L. helveticus* – у четырех штаммов. Для всех референсных коллекционных штаммов результаты идентификации, выполненной методами MALDI-TOF MS и секвенирования гена 16S рНК, совпали с их видовой принадлежностью, что свидетельствует о надежности использованных нами подходов. Достоверную видовую идентификацию остальных штаммов лактобацилл указанными методами осуществить не удалось, поэтому в работе они обозначены как *Lactobacillus* sp.

2 Характеристика устойчивости лактобацилл к антибиотикам

В данной работе для 72 штаммов лактобацилл определили уровни устойчивости к 25 антибиотикам различных классов, а также охарактеризовали молекулярные механизмы антибиотикорезистентности. Показали, что вне зависимости от источника выделения, исследуемые лактобациллы демонстрировали типичный для данной группы микроорганизмов профиль антибиотикорезистентности. Все штаммы (за исключением двух пробиотических штаммов) характеризовались множественной устойчивостью к антибиотикам (MAR>0.2). Высокие MAR индексы свидетельствуют о том, что среда обитания исследованных лактобацилл часто подвергается воздействию антибиотиков – продуцируемых другими членами микробного сообщества или вносимых намеренно/случайно человеком. Широко распространенная среди исследованных лактобацилл множественная устойчивость к антибиотикам в основном относится к природной. Большинство лактобацилл были устойчивы к ванкомицину, цефалоспоринам, фторхинолонам и аминогликозидам (рисунок 1).

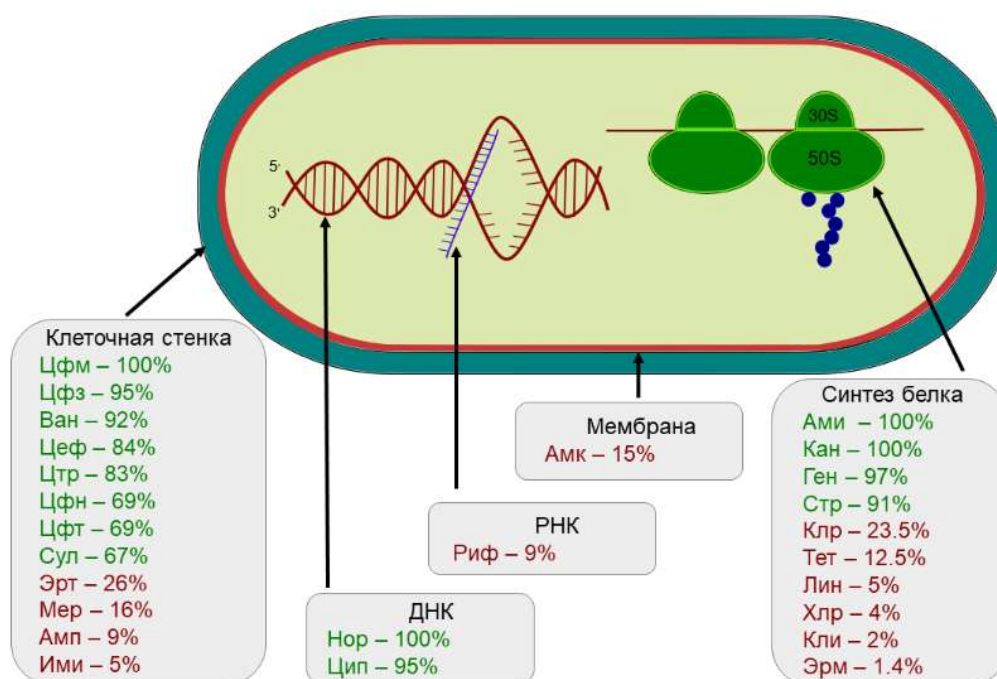


Рисунок 1 – Устойчивость исследованных лактобацилл к антибактериальным препаратам. За 100% принято общее количество исследованных штаммов лактобацилл. Зеленый шрифт – природная устойчивость. Красный шрифт – антибиотики, к которым лактобациллы, как правило, чувствительны; обнаруженная устойчивость с высокой вероятностью является приобретенной и потенциально мобильной. Ами – амикацин; Амк – амоксициллин; Амп – ампициллин; Ван – ванкомицин; Ген – гентамицин; Ими – имипенем; Кан – канамицин; Клр – кларитромицин; Лин – линезолид; Мер – меропенем; Нор – норфлоксацин; Риф – рифампицин; Стр – стрептомицин; Сул – цефоперазон/сульбактам; Тет – тетрациклин; Хлр – хлорамфеникол; Цеф – цефоперазон; Цип – ципрофлоксацин; Цтр – цефтриаксон; Цфз – цефтазидим; Цфм – цефепим; Цфн – цефазолин; Цфт – цефотаксим; Эрм – эритромицин; Эрт – эртапенем.

Как правило, устойчивость к ванкомицину кодируется целым кластером генов (*vanA*, *vanE*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY* и *vanZ*), в котором ключевым геном является *vanA*. У исследованных лактобацилл мы не выявили гены *vanA* и *vanE*, но детектировали ген *vanX* в хромосомной ДНК 62% штаммов (таблица 1, рисунок 2а). Биохимическая роль гена *vanX* заключается в снижении количества D-Ala-D-Ala в клетке. Наряду с *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanY* и *vanZ*, он, как правило, играет второстепенную роль в устойчивости бактерий к гликопептидам, то есть не может самостоятельно обеспечивать устойчивость к ванкомицину, но способен усиливать эффект других генов *van* кластера.

Устойчивость лактобацилл к цефалоспорином считается природной и, вероятно, связана с непроницаемостью клеточной стенки или неспецифическими белками-транспортерами (эффлюксом). Недавно стало известно, что устойчивость лактобацилл к цефалоспорином может быть также обусловлена наличием у них β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). В данном исследовании мы обнаружили ген *blaTEM* в хромосомной ДНК 83% исследованных штаммов лактобацилл, в то время как гены *blaSHV* и *blaOXA-1* детектировали значительно реже (у 11% и 8.3% штаммов, соответственно) (таблица 1 и рисунок 2б). Полученные нами результаты – это первые свидетельства обнаружения генов БЛРС у лактобацилл, выделенных

из силоса, ферментированных пищевых продуктов растительного происхождения, кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов.

Таблица 1 – Гены антибиотикорезистентности, обнаруженные у исследованных лактобацилл методом ПЦР

№	Штамм	Генотип
Коллекционные штаммы		
1	<i>L. brevis</i> DSM 20054	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
2	<i>L. hilgardii</i> LMG 7934	<i>parC^x; blaTEM^x; blaSHV^x; blaOXA-1^x</i>
3	<i>L. buchneri</i> DSM 20057	<i>tetK^x; parC^x; blaTEM^x; blaSHV^x; blaOXA-1^x</i>
4	<i>L. rhamnosus</i> B-8238	<i>aadA^x; blaTEM^x</i>
Изоляты из силоса и ферментированных пищевых продуктов растительного происхождения		
5	<i>L. plantarum</i> FCa1L	<i>vanX^x; parC^x; aadE^x; blaTEM^x; tetL^x</i>
6	<i>L. plantarum</i> FCa3L	<i>blaTEM^x</i>
7	<i>L. plantarum</i> S1	<i>vanX^x; blaTEM^x; tetL^x</i>
8	<i>L. plantarum</i> S6	<i>vanX^x</i>
9	<i>L. plantarum</i> S7	<i>vanX^x</i>
10	<i>L. plantarum</i> AG1	<i>vanX^x; aadE^x; blaTEM^x; blaSHV^x; ermB^x</i>
11	<i>L. plantarum</i> AG8	<i>vanX^x; blaTEM^x; blaSHV^x</i>
12	<i>L. plantarum</i> AG9	<i>vanX^x; ermB^x</i>
13	<i>L. plantarum</i> AG10	<i>vanX^x; aadE^x; blaTEM^x; ermB^x</i>
14	<i>L. plantarum</i> AG15	<i>vanX^x; blaTEM^x; mefA^x; tetL^x</i>
15	<i>L. fermentum</i> AG16	<i>vanX^x; blaTEM^x</i>
Изоляты из желудочно-кишечного тракта		
16	<i>L. fermentum</i> HF-A1	<i>tetMⁿ; tetKⁿ</i>
17	<i>L. fermentum</i> HF-A4	<i>tetMⁿ; tetKⁿ</i>
18	<i>L. fermentum</i> HF-B1	<i>tetMⁿ; tetKⁿ</i>
Изоляты из кисломолочных продуктов		
19	<i>L. fermentum</i> BB	<i>blaTEM^x</i>
20	<i>L. fermentum</i> 1-3	<i>vanX^x; blaTEM^x; blaOXA-1^x</i>
21	<i>L. fermentum</i> 3-4	<i>ermCⁿ; tetMⁿ; tetKⁿ</i>
22	<i>L. fermentum</i> 5-1	<i>ermB^x; tetMⁿ; tetKⁿ; vanX^x</i>
23	<i>L. fermentum</i> 5-2	<i>tetMⁿ; tetKⁿ</i>
Штаммы, выделенные из пробиотических препаратов		
24	<i>L. fermentum</i> Ga	<i>vanX^x; blaTEM^x</i>
25	<i>L. plantarum</i> Na	<i>vanX^x; blaTEM^x</i>
26	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-1	<i>parC^x; blaTEM^x</i>
27	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-2	<i>blaTEM^x</i>
28	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-5	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
29	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-7	<i>parC^x; blaTEM^x</i>
30	<i>L. plantarum</i> RiaF-8	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
31	<i>L. plantarum</i> Act-1	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
32	<i>L. plantarum</i> Act-2	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
33	<i>L. plantarum</i> Act-3	<i>parC^x; blaTEM^x</i>
34	<i>L. plantarum</i> Lnk-1	<i>vanX^x; blaTEM^x</i>
35	<i>L. paracasei</i> E-1	<i>vanX^x; blaTEM^x; tetK^x</i>
36	<i>L. paracasei</i> E-2	<i>blaTEM^x</i>
37	<i>L. paracasei</i> E-3	<i>vanX^x; parC^x</i>
38	<i>L. helveticus</i> Al-1	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
39	<i>L. helveticus</i> Al-2	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
40	<i>L. helveticus</i> Al-3	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>
41	<i>L. helveticus</i> Al-4	<i>vanX^x; parC^x; blaTEM^x</i>

x - хромосомная ДНК, n - плазмидная ДНК

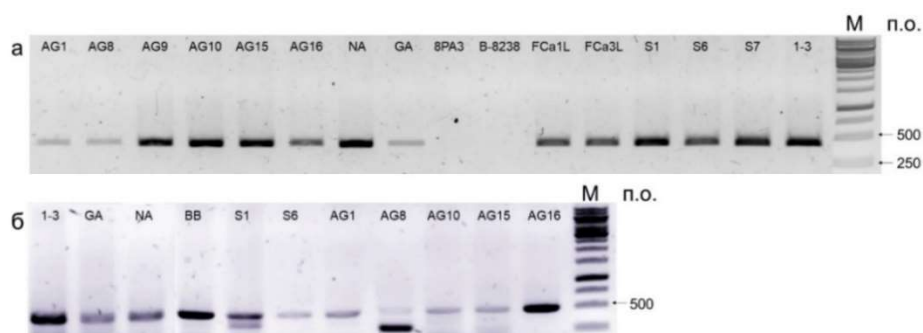


Рисунок 2 - Обнаружение генов *vanX* (а) и *blaTEM* (б) методом ПЦР в хромосомной ДНК лактобацилл. М – маркер длины ДНК («GeneRuler 1 kb DNA Ladder» Thermo Scientific, США). Наименования штаммов представлены в таблице 1.

Устойчивость лактобацилл к фторхинолонам также считается природной, но ее точный механизм пока не установлен. Одним из механизмов устойчивости к хинолонам у грамположительных бактерий являются мутации в QRDR областях генов *gyrA* и *parC*, кодирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, соответственно. У лактобацилл такие мутантные гены обнаруживаются достаточно редко. Действительно, ген *parC* мы детектировали только у 27% исследованных лактобацилл, а ген *gyrA* выявлен не был (таблица 1, рисунок 3).

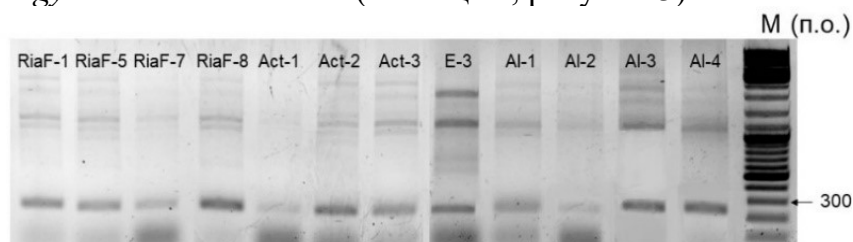


Рисунок 3 - Обнаружение гена *parC* методом ПЦР в хромосомной ДНК лактобацилл. М – маркер длины ДНК («GeneRuler Low Range DNA Ladder» Thermo Scientific, США). Наименования штаммов представлены в таблице 1.

Устойчивость лактобацилл к аминогликозидам связывают с низкой проницаемостью мембран лактобацилл для антибактериальных препаратов этой группы. Тем не менее, приобретенная устойчивость к аминогликозидам также встречается среди лактобацилл. Мы проверили наличие генов, ответственных за энзиматическую модификацию стрептомицина (*ant(6)*, *aadA* и *aadE*), канамицина (*aph(3')*-III и *aph(2)*), амикацина и гентамицина (*ant(2)*-I *aac(6)*) в геномах 54 штаммов лактобацилл. Согласно полученным результатам, большинство исследованных лактобацилл (93% штаммов) не содержат этих генов, но три штамма, выделенные из растительного сырья (*L. plantarum* FCa3L, *L. plantarum* AG1 и *L. plantarum* AG10) и коллекционный штамм *L. rhamnosus* B-8238 несут гены устойчивости к стрептомицину *aadA* и *aadE* (таблица 1, рисунок 4). На фенотипическом уровне все четыре штамма также характеризовались резистентностью к стрептомицину. Полученный результат накладывает серьезные ограничения на практическое применение штаммов *L. rhamnosus* B-8238, *L. plantarum* FCa3L, *L. plantarum* AG1 и *L. plantarum* AG10, поскольку они могут способствовать распространению устойчивости к аминогликозидам.

Полученные данные указывают на низкую значимость приобретенных механизмов для формирования устойчивости лактобацилл к аминогликозидам, цефалоспорином, фторхинолонам и ванкомицину. Тем не менее, возможность

горизонтального транспорта обнаруженных генов БЛРС требует дальнейших более тщательных исследований.

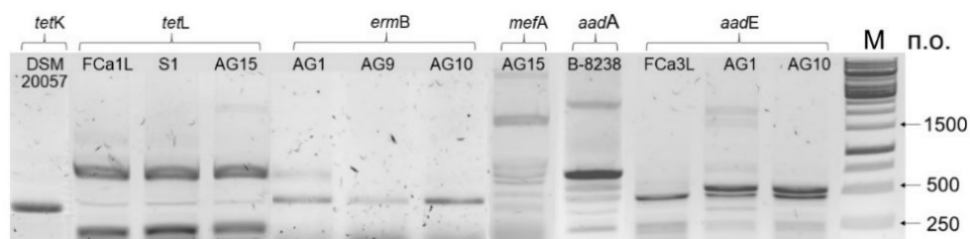


Рисунок 4 – Обнаружение генов устойчивости к тетрациклину, эритромицину и стрептомицину методом ПЦР в хромосомной ДНК лактобацилл. М – маркер длины ДНК («GeneRuler 1 kb DNA Ladder» Thermo Scientific, США). Наименования штаммов представлены в таблице 1.

Резистентность к тетрациклину, клиндамицину, макролидам, хлорамфениколу, линезолиду, ампициллину, карбапенемам, рифампицину и амоксициллину встречалась значительно реже (рисунок 1).

Особого внимания заслуживает устойчивость лактобацилл к эритромицину и тетрациклину, поскольку гены устойчивости к данным антибиотикам часто локализованы на конъюгативных плазмидах и транспозонах.

Поэтому кроме качественного определения чувствительности с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) выполнили количественную оценку чувствительности лактобацилл к этим антибиотикам, определив значения МПК. Результаты определения МПК тетрациклина и эритромицина для лактобацилл представлены в таблице 2.

Показали, что среди исследованных лактобацилл только один штамм – *L. fermentum* 5-1 – проявлял промежуточную устойчивость к эритромицину, что соответствует его R статусу, установленному с помощью ДДМ. У остальных исследованных штаммов, в том числе у *L. fermentum* Ga и *L. plantarum* 8PA3, отнесенных к промежуточно устойчивым к эритромицину с помощью ДДМ, МПК не превышали ЕСOFF, поэтому мы отнесли их к чувствительным к эритромицину (таблица 2). На основании установленных МПК для 17 исследованных штаммов лактобацилл подтвердили результаты определения чувствительности к тетрациклину, полученные с помощью ДДМ. Для остальных семи исследованных штаммов, установленный с помощью ДДМ статус устойчивости к тетрациклину был пересмотрен. Пять штаммов с I статусом мы отнесли к чувствительным к тетрациклину (таблица 2 №1, 20-23) и два с S статусом – к промежуточно устойчивым (таблица 2 № 7, 24).

У лактобацилл описаны два механизма генотипической резистентности к макролидам: за счет метилирования молекул 23S рРНК продуктом гена *erm* (A, B, C, T и др.) и за счет приобретения аденозин-5'-трифосфат-зависимых эффлюксных белков – продуктов генов *mef*. Ген *ermB* считается самым распространенным среди генов устойчивости к эритромицину у лактобацилл и часто бывает приобретенным. В данной работе мы детектировали ген *ermB* у четырех штаммов: у эритромицин-резистентного штамма *L. fermentum* 5-1 и эритромицин-чувствительных штаммов *L. plantarum* AG1, AG9 и AG10, причем во всех этих случаях ген *ermB* был локализован в хромосомной ДНК (таблица 1). Вероятно, у трех последних штаммов *ermB* не имеет фенотипического проявления вследствие отсутствующей или недостаточной экспрессии. Также «молчащие» гены устойчивости к

эритромицину мы выявили в плазмидной ДНК *L. fermentum* 3-4 (ген *ermC*) (таблица 1) и хромосомной ДНК *L. plantarum* AG15 (ген *mefA*) (таблица 1, рисунок 4). Отметим, что в нашей работе ген *ermC* был детектирован у представителей вида *L. fermentum* впервые.

Таблица 2 – Характеристика устойчивости лактобацилл к тетрациклину и эритромицину

№	Штамм	Тет			Эрт		
		ДДМ	МПК, мкг/мл Отношение к антибиотику		ДДМ	МПК, мкг/мл Отношение к антибиотику	
1	<i>L. buchneri</i> DSM 20057	I	32	S	S	0.25	S
2	<i>L. fermentum</i> HF-A1	I	64	R	S	0.25	S
3	<i>L. fermentum</i> HF-A4	I	64	R	S	0.25	S
4	<i>L. fermentum</i> HF-B1	I	64	R	S	0.25	S
5	<i>L. fermentum</i> HF-E1	I	16	R	S	0.25	S
6	<i>L. fermentum</i> 3-4	R	16	R	S	0.25	S
7	<i>L. fermentum</i> 5-1	S	8	I	R	1	I
8	<i>L. fermentum</i> 5-2	R	32	R	S	0.25	S
9	<i>L. plantarum</i> FCa1L	S	16	S	S	0.25	S
10	<i>L. plantarum</i> Fca3L	S	16	S	S	0.25	S
11	<i>L. plantarum</i> S1	S	16	S	S	0.25	S
12	<i>L. plantarum</i> AG1	S	16	S	S	0.25	S
13	<i>L. plantarum</i> AG9	S	16	S	S	0.25	S
14	<i>L. plantarum</i> AG10	S	16	S	S	0.25	S
15	<i>L. plantarum</i> AG15	S	16	S	S	0.25	S
16	<i>L. fermentum</i> Ga	S	2	S	I	0.25	S
17	<i>L. plantarum</i> Na	S	2	S	S	0.25	S
18	<i>L. plantarum</i> 8PA3	S	2	S	I	0.25	S
19	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-1*	I	32	I	S	0.25	S
20	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-5*	I	16	S	S	0.25	S
21	<i>Lactobacillus</i> sp. RiaF-7*	I	16	S	S	0.25	S
22	<i>L. plantarum</i> RiaF-8	I	16	S	S	0.25	S
23	<i>L. plantarum</i> Lnk-1	I	16	S	S	0.25	S
24	<i>L. paracasei</i> E1	S	4	I	S	0.25	S

* – Согласно результатам MALDI-TOF MS *Lactobacillus* sp. Предположительно относится к виду *L. plantarum*; Эпидемиологическая точка отсечения для эритромицина составляет 1 мкг/мл, для тетрациклина она видоспецифична: 32 мкг/мл – у *L. plantarum*, 8 мкг/мл – у *L. fermentum*, 4 мкг/мл – у *L. paracasei* и 128 мкг/мл у *L. buchneri* [EFSA, 2018]. S – чувствительный, I – промежуточный, R – устойчивый.

Значения МПК устойчивых к тетрациклину штаммов варьировали в диапазоне от 8 до 64 мкг/мл (таблица 2). Такая слабая устойчивость к антибиотикам, как правило, является природной и кодируется хромосомными генами. Хромосомный ген *tetK* был выявлен у *L. paracasei* E1 (таблица 1), а у штаммов *L. fermentum* HF-A1, HF-B1, HF-A4, 3-4, 5-1 и 5-2 мы выявили плазмидные гены *tetM* и *tetK* (таблица 1). Эти гены детерминируют два разных механизма устойчивости к тетрациклину: эффлюкс (*tetK*) и защиту рибосомы (*tetM*).

В ряде случаев фенотип антибиотикорезистентности не соответствовал обнаруженному генотипу. У двух промежуточно устойчивых к тетрациклину штаммов (*L. fermentum* HF-E1 и *Lactobacillus* sp. RiaF-1) мы не обнаружили ни одного из исследуемых *tet* генов. В данном случае, по-видимому, устойчивость кодируется другими, не исследуемыми в данной работе генетическими

детерминантами. С другой стороны, в хромосомной ДНК чувствительных к тетрациклину штаммов *L. plantarum* FCa1L, *L. plantarum* S1, *L. plantarum* AG15 и *L. buchneri* DSM 20057 мы выявили гены *tetL* и *tetK* (таблица 1, рисунок 4). Важно отметить, что гены антибиотикорезистентности, не имеющие фенотипического проявления, также могут быть переданы другим микроорганизмам.

3 Горизонтальный транспорт генов устойчивости к антибиотикам от лактобацилл *in vitro*

В данной работе, нацеленной на исследование горизонтального транспорта генов антибиотикорезистентности от лактобацилл к другим грамположительным и грамотрицательным бактериям, мы проверили возможность передачи генов устойчивости к тетрациклину *tetK* и *tetM* от семи штаммов лактобацилл (*L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-1, *L. fermentum* 5-2 и *L. paracasei* E1) к грамположительным (*Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* 88K, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) и грамотрицательным бактериям (*Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*). Также мы исследовали возможность приобретения бактериями *Staphylococcus haemolyticus* гена устойчивости к эритромицину *ermB* от *L. fermentum* 5-1.

Критериями для отбора реципиентных бактерий являлись: 1) отсутствие фенотипической и генотипической устойчивости к тетрациклину и/или эритромицину; 2) наличие резистентности к селективным антибиотикам, т.е. антибиотикам, к которым лактобациллы проявляют чувствительность. С помощью метода градиентного агара установили, что бактерии *C. freundii*, *A. baumannii*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* ATCC, *L. monocytogenes* 88K проявляют чувствительность к тетрациклину (МПК < 0.5 мкг/мл) и устойчивость по меньшей мере к одному из предложенных селективных антибиотиков. Кроме того, методом ПЦР установили, что в их геномах отсутствуют гены *tetK* и *tetM*.

S. haemolyticus экспериментально отобрали в качестве реципиента для исследования передачи генов устойчивости к эритромицину от лактобацилл, поскольку: (i) этот штамм проявлял чувствительность к эритромицину (МПК < 0.5 мкг/мл); (ii) у него не выявлен ген устойчивости к эритромицину *ermB*; (iii) он устойчив к селективным антибиотикам – хлорамфениколу (МПК = 64 мкг/мл) и ампициллину (МПК > 100 мкг/мл).

В проведенных нами экспериментах, моделирующих *in vitro* основной механизм горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности в природе – конъюгацию, мы показали, что ген *ermB*, имеющий хромосомную локализацию, не передается от лактобацилл *L. fermentum* 5-1 к реципиентным бактериям *S. haemolyticus*.

В данной работе возможность конъюгативного переноса генов устойчивости к тетрациклину от лактобацилл-доноров к условно-патогенным реципиентам исследовали в эксперименте «конъюгация на мембране» и при совместном культивировании доноров и реципиентов в буфере, имитирующем содержимое кишечника человека. Перенос генов не был зафиксирован ни в одном из вариантов исследования. В геномах лактобацилл, несущих гены устойчивости к тетрациклину, также не обнаружили последовательности *int* и *int-tetM*, ассоциированные с конъюгативным транспозоном *Tn916*, который, по данным литературы, способствует распространению гена *tetM* от лактобацилл к другим

бактериям. По-видимому, устойчивые к тетрациклину лактобациллы *L. fermentum* (HF-A1, HF-B1, HF-A4, 5-1, 3-4, 5-2) и *L. paracasei* E-1 не способны передавать гены *tetK* и *tetM* реципиентным бактериям посредством конъюгации в условиях *in vitro*.

Далее мы проверили возможность передачи генов устойчивости к тетрациклину от лактобацилл в процессе трансформации. В качестве доноров использовали бактерии *L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-1, *L. fermentum* 5-2, устойчивость к тетрациклину которых ассоциирована с плазмидными генами *tetM* и *tetK*. В качестве реципиентов использовали грамотрицательные микроорганизмы *C. freundii*, *A. baumannii* и *E. coli*.

Исследовав трансформацию с электропорацией у 18 бактериальных пар, только в случае штамма *L. fermentum* 5-1 обнаружили появление у *C. freundii* устойчивости к тетрациклину (рисунок 5в). Из бактерий-трансформантов, выросших на селективной среде с тетрациклином, выделили ДНК и в ней методом ПЦР детектировали ген *tetK* размером 278 п.о. (рисунок 5б).

Это первое экспериментальное свидетельство передачи гена устойчивости к тетрациклину от лактобацилл в процессе трансформации. Хотя молекулярные основы этого процесса требуют дальнейшего более детального исследования, полученный нами результат доказывает, что внеклеточная ДНК лактобацилл может вносить пагубный вклад в проблему распространения резистентности к антибиотикам.

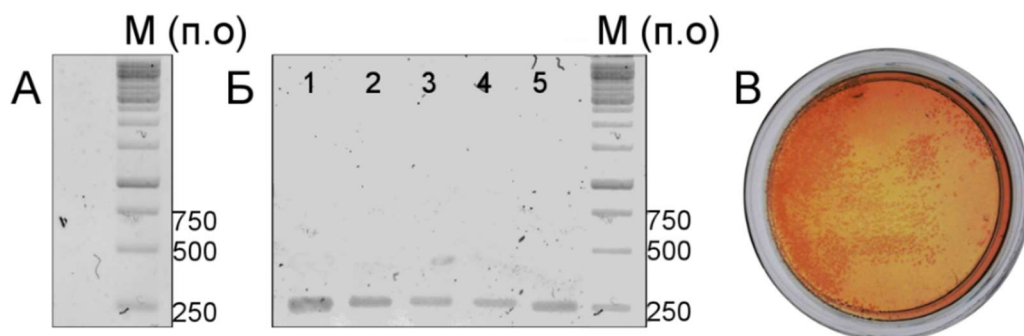


Рисунок 5 – Передача гена устойчивости к тетрациклину *tetK*, находящегося в плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1, бактериям *C. freundii* в процессе трансформации с электропорацией. А - Электрофорез ПЦР-продуктов амплификации гена *tetK* в геномной ДНК нативных клеток *C. freundii*; Б – Детекция гена *tetK* в геномной ДНК *C. freundii* выросших на среде с тетрациклином после трансформации с использованием плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1 (дорожки 1-5); В – Рост трансформантов *C. freundii* на среде с тетрациклином после электропорации с использованием плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1.

3 Горизонтальный транспорт генов устойчивости к антибиотикам от лактобацилл *in vivo*

На завершающем этапе работы проверили возможность передачи генов антибиотикорезистентности от лактобацилл бактериям кишечной микробиоты мышей, которым в течение двух недель вводили *per os* смесь из четырех штаммов-доноров генов антибиотикорезистентности: *L. fermentum* 5-1, *L. plantarum* AG1, *L. paracasei* E1 и *L. plantarum* Act-2. Эти лактобациллы несут гены устойчивости к ванкомицину *vanX* (все штаммы), цефалоспорином *blaTEM* (*L. paracasei* E1, *L. plantarum* Act-2), ципрофлоксацину *parC* (*L. plantarum* Act-2), стрептомицину

aadE (*L. plantarum* AG1), эритромицину *ermB* (*L. fermentum* 5-1, *L. plantarum* AG1), тетрациклину *tetK* (*L. paracasei* E1, *L. fermentum* 5-1) и *tetM* (*L. fermentum* 5-1).

О динамике численности лактобацилл в образцах судили по результатам ПЦР-РВ амплификации видоспецифичной для лактобацилл межгенной спейсерной области 16S-23S рРНК. О выживаемости в ЖКТ мышей вводимых лактобацилл судили по результатам ПЦР-РВ амплификации гена *vanX*, присутствующего в хромосомной ДНК всех лактобацилл-доноров. Согласно результатам ПЦР-РВ гена *vanX* и спейсерной области 16S-23S рРНК, представленным в таблице 3, после первой недели введения коктейля лактобацилл-доноров мышам количество лактобацилл в ЖКТ мышей опытной группы увеличилось в 12 раз по сравнению с исходным уровнем, причем данный рост обусловлен вводимыми лактобациллами. Спустя еще одну неделю введения коктейля из лактобацилл-доноров мышам количество лактобацилл в образцах фекалий экспериментальной группы снизилось почти до исходного значения. Полученный результат указывает на низкую выживаемость вводимых лактобацилл в ЖКТ мышей. Вероятно, у опытных животных происходит стабилизация кишечного микробного сообщества, и оно становится более резистентным к интродукции новых членов. Согласно полученным результатам, вводимые лактобациллы имели транзитный характер пребывания в пищеварительном тракте мышей и не колонизировали его. Тем не менее, введение лактобацилл оказало влияние на собственные лактобациллы кишечной микробиоты мышей, и спустя неделю после окончания введения коктейля из лактобацилл (на 21 день эксперимента) в фекалиях опытной группы отмечено возрастание количества лактобацилл в 13.5 раз над исходным уровнем. У контрольной группы мышей, которые не получали коктейль из лактобацилл-доноров, в образцах фекалий в течение всего времени эксперимента отмечены лишь незначительные колебания содержания собственных лактобацилл, а ген *vanX* не обнаруживался (таблица 3). На 14 и 21 день эксперимента, когда относительная копия гена *vanX* в образцах фекалий опытной группы мышей снижалась (таблица 3), устойчивость к ванкомицину у культивируемой части микробного кишечного сообщества возрастала (таблица 4). По-видимому, в тот период, когда количество вводимых лактобацилл в пищеварительном тракте мышей было значительным (7 день), произошло накопление ферментов (лигазы, дипептидазы, дигидрогеназы), обеспечивающих резистентность бактерий к ванкомицину [Faron *et al.*, 2016].

Согласно полученным значениям МПК цефотаксима и стрептомицина для культивируемой части микробиоты фекалий, отношение кишечного микробного сообщества к этим антибиотикам в течение 21 дня эксперимента не изменялось. Устойчивость фекальной микробиоты мышей к эритромицину, цiproфлорксацину, цефазолину и цефтриаксону увеличилась, но этот рост устойчивости не зависел от введения лактобацилл (таблица 4). Поэтому мы полагаем, что он связан с возрастными изменениями кишечного микробного сообщества у мышей. Известно, что микробиота ЖКТ у мышей зависит от помета, состояния внешней среды и типа вскармливания; она нестабильна в начале жизни и устанавливается только во взрослом возрасте [Чичерин с соавт., 2012; Aleman and Valenzano, 2019; Caruso *et al.*, 2019]. Гены *ermB*, *aadE*, *parC* и *blaTEM*, которые детерминируют устойчивость к эритромицину, стрептомицину, цiproфлорксацину и цефалоспорином, в тотальной ДНК фекалий мышей обеих групп методом ПЦР-РВ обнаружить не удалось. Следовательно, пероральное введение лактобацилл подопытным

животным не приводило к амплификации этих генов в микробном сообществе ЖКТ. Таким образом, мы показали, что вводимые лактобациллы не являлись источником распространения генов устойчивости к эритромицину, стрептомицину, ципрофлоксацину и цефалоспорином в кишечном микробном сообществе мышей.

Таблица 3 – Генетические детерминанты, обнаруженные методом ПЦР-РВ в тотальной ДНК, выделенной из фекалий мышей

День эксперимента	Ген											
	<i>tetM</i>				<i>vanX</i>				<i>16S-23S pPHK</i>			
	К		ЛБ		К		ЛБ		К		ЛБ	
	Ct	2 ^{-ΔCt}	Ct	2 ^{-ΔCt}	Ct	2 ^{-ΔCt}	Ct	2 ^{-ΔCt}	Ct	2 ^{-ΔCt}	Ct	2 ^{-ΔCt}
1 день	32.2±0.56	1	31.3±0.7	1	30.3±0.1	1	31.5±0.28	1	18.3±0.1	1	23.3±0.42	1
7 день	31.6±0.66	1.3	25±0.06	78.4	32.2±0.31	0.4	27.9±0.61	11.9	16.9±0.57	2.56	19.7±0.52	11.63
14 день	30.8±0.41	2.4	23.1±0.25	303	32.5±0.77	0.3	29.9±0.24	2.9	17.9±0.48	1.24	22.5±0.65	1.69
21 день	29.4±0.38	6.3	26.4±0.46	30.4	31.8±0.82	0.3	31.7±0.16	1.1	18.7±0.68	0.74	19.5±0.47	13.59

К – группа мышей, получавших физраствор; ЛБ – группа мышей, получавших лактобациллы; Ct – пороговый цикл; 2^{-ΔCt} – относительная копия генов; 2^{-ΔCt} <1 уменьшение копия гена в сравнении с исходным значением (2^{-ΔCt} в первый день эксперимента), >1 увеличение и 1 – отсутствие изменений.

Таблица 4 – Минимальная подавляющая концентрация антибиотиков для культивируемой части микробного сообщества фекалий исследуемых мышей, мкг/мл

День эксперимента	ТЕТ		ЭРМ		ВАН		ЦИП		ЦФТ		ЦФН		ЦТР		СТР	
	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ	К	ЛБ
1 день	16	16	16	16	128	128	1	1	128	128	64	64	128	128	128	128
7 день	32	128	64	64	128	128	4	4	128	128	128	1024	256	256	128	128
14 день	32	256	64	64	128	516	4	4	128	128	128	1024	516	516	128	128
21 день	16	256	64	64	128	256	4	4	128	128	1024	1024	516	516	128	128

К – группа мышей, получавших физраствор; ЛБ – группа мышей, получавших лактобациллы; Ван – ванкомицин; Стр – стрептомицин; Тет – тетрациклин; Цип – ципрофлоксацин; Цтр – цефтриаксон; Цфн – цефазолин; Цфт – цефотаксим; Эрм – эритромицин.

Обнаружили, что введение мышам лактобацилл привело к повышению уровня устойчивости к тетрациклину у культивируемой части микробного сообщества ЖКТ исследуемых животных в 16 раз (таблица 4). При этом ген устойчивости к тетрациклину *tetK* не удалось детектировать методами ПЦР и ПЦР-РВ в тотальной ДНК фекалий обеих групп мышей. Отсутствие гена *tetK* в кишечнике опытной группы мышей, вероятно, связано с низкой выживаемостью вводимых лактобацилл *L. fermentum* 5-1 и *L. paracasei* E1 в организме животных. С помощью метода ПЦР-РВ мы детектировали увеличение относительной копия гена устойчивости к тетрациклину *tetM* в тотальной ДНК фекалий мышей, получавших лактобациллы, по сравнению с контрольной группой (таблица 3). Относительная копия гена *tetM* в фекалиях опытной группы мышей осталась на высоком уровне и после отмены введения лактобацилл (таблица 3). Мы сопоставили количество гена *tetM* в фекалиях опытной группы мышей с численностью в них вводимых лактобацилл, измеренной по относительной копия гена *vanX*, и общим количеством лактобацилл, измеренным по

относительной копии участка 16S-23S рННК, и полагаем, что увеличение содержания гена *tetM* в фекалиях опытной группы вызвано его распространением и амплификацией в бактериях кишечной микробиоты мышей, а не в клетках лактобацилл. Наличие гена *tetM* в фекалиях опытной группы мышей также подтверждено методом ПЦР и секвенированием полученного ампликона (рисунок 6). Показали, что полученный сиквенс на 99% гомологичен гену *tetM* *Enterococcus faecalis* JH2-2 (GenBank MG437052.1) и *Listeria monocytogenes* Lm16 (GenBank MF145699.1).

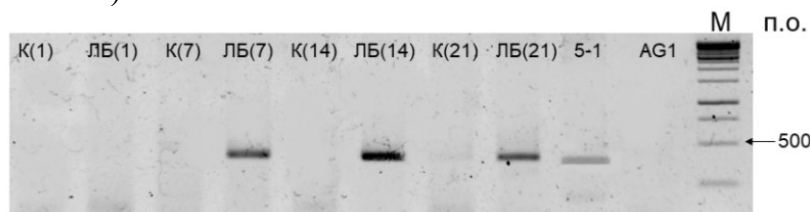


Рисунок 6 – Обнаружение гена *tetM* в тотальной ДНК фекалий мышей. К - ДНК фекалий мышей контрольной группы; ЛБ – ДНК фекалий мышей, которым вводили *per os* смесь лактобацилл; (1), (7), (14), (21) – день эксперимента; 5-1 – *L. fermentum* 5-1 (положительный контроль), AG1 - *L. plantarum* AG1 (отрицательный контроль). М – маркер длины ДНК («GeneRuler 1 kb DNA Ladder» Thermo Scientific, США).

Среди четырех штаммов лактобацилл, использованных в данном эксперименте в качестве доноров генов антибиотикорезистентности, только *L. fermentum* 5-1 обладал геном *tetM*. Таким образом, в проведенном *in vivo* эксперименте мы получили экспериментальное свидетельство того, что при употреблении в пищу несущих гены устойчивости к тетрациклину лактобацилл *L. fermentum* 5-1 ген устойчивости *tetM* может быть передан другим членам кишечной микробиоты. Ранее мы установили, что при трансформации бактерий *C. freundii* плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1 происходит передача гена *tetK* (рисунок 5). Полученные нами результаты указывают на то, что бактерии *L. fermentum* 5-1, несущие гены *tetM* и *tetK* на плазмидной ДНК, могут служить потенциальными векторами распространения генов антибиотикорезистентности в кишечном микробиоме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования создана коллекция из 68 штаммов лактобацилл, выделенных из кисломолочных продуктов, растительного сырья, ЖКТ человека и пробиотиков. С помощью полифазного подхода, интегрирующего разные методы идентификации бактерий, удалось точно установить видовую принадлежность 39 штаммов лактобацилл. Для исследованных лактобацилл определены уровни устойчивости к 25 антибиотикам различных классов, а также охарактеризованы молекулярные механизмы антибиотикорезистентности. Все штаммы (за исключением двух пробиотических штаммов) характеризовались множественной устойчивостью к антибиотикам. Впервые у лактобацилл, не ассоциированных с инфекционными заболеваниями, обнаружены гены, кодирующие β -лактамазы расширенного спектра действия. В плазмидной и хромосомной ДНК лактобацилл обнаружены потенциально мобильные гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину. Среди 72 исследованных штаммов лактобацилл единственным потенциальным источником распространения генетических детерминант устойчивости антибиотикорезистентности явились

бактерии *L. fermentum* 5-1, выделенные нами из ряженки. Данный промышленный штамм характеризуется промежуточной (низкой) устойчивостью к тетрациклину, детерминированной двумя плазмидными генами *tetM* и *tetK*. Исследовав возможность транспорта данных генов в различных экспериментальных условиях, зафиксирована передача гена *tetK* от *L. fermentum* 5-1 бактериям *C. freundii* в процессе трансформации, а также гена *tetM* – бактериям кишечной микробиоты белых мышей. Полученный нами результат является свидетельством потенциального участия лактобацилл, ассоциированных с продуктами питания, в распространении антибиотикорезистентности – одной из основных проблем здравоохранения в мире.

Полученные экспериментальные данные позволили сформулировать следующие основные выводы:

1) Из кисломолочных продуктов, растительного материала, фекалий человека и пробиотиков выделены 68 штаммов лактобацилл и установлен их таксономический статус с помощью MALDI Biotyper и секвенирования гена 16S рРНК.

2) Определены уровни устойчивости лактобацилл к ванкомицину, аминогликозидам, фторхинолонам, цефалоспорином, карбапенемам, пенициллинам, макролидам, клиндамицину, линезолиду, хлорамфениколу, тетрациклину, рифампицину. Большинство исследованных лактобацилл характеризовались множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам: проявляли устойчивость к ванкомицину, аминогликозидам, фторхинолонам, цефалоспорином.

3) С помощью ПЦР-анализа в хромосомах лактобацилл выявлены детерминанты устойчивости к ванкомицину (*vanX* у 62% исследованных штаммов), ципрофлоксацину (*parC* – 27%) стрептомицину (*aadA* – 1.8% и *aadE* – 5.5%), цефалоспорином (*blaTEM* – 83%, *blaSHV* – 11%, *blaOXA-1* – 8.3%). В плазмидной и хромосомной ДНК лактобацилл обнаружены потенциально мобильные гены устойчивости к тетрациклину (*tetK* – 15%, *tetM* – 11%, *tetL* – 5.5%) и эритромицину (*ermB* – 1.8%, *ermC* – 1.8%, *mefA* – 1.8%).

4) Впервые показано, что бактерии *Lactobacillus fermentum* 5-1, несущие плазмидные гены *tetM* и *tetK*, могут служить векторами распространения генов устойчивости к тетрациклину в кишечном микробиоме *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в индексируемых журналах:

- 1) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность и мобильность ее генетических детерминант у штамма *Lactobacillus fermentum* / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2020. – Т. 38 (4). – С. 162-169. (РИНЦ, ВАК)
- 2) Gavrilova E. Newly isolated lactic acid bacteria from silage targeting biofilms of foodborne pathogens during milk fermentation / E. Gavrilova, **E. Anisimova**, A. Gabdelkhadieva, E. Nikitina, A. Vafina, D. Yarullina, M. Bogachev, A. Kayumov // BMC Microbiology. – 2019. – V.19. I.1. – 12 p. (Scopus, Web of Science)
- 3) **Anisimova E.A.** Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // Current Microbiology. – 2019. – V.76. I.12 – P.1407-1416. (Scopus, Web of Science)
- 4) **Anisimova E.** Characterization of erythromycin and tetracycline resistance in *Lactobacillus fermentum* strains / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // International Journal of Microbiology. – 2018. – Art. № 3912326. – 9 p. (Scopus, Web of Science)

5) **Анисимова Е.А.** Антагонистическая активность лактобацилл, выделенных из природных эконийш / Е.А. Анисимова, О.Н. Ильинская, Д.Р. Яруллина // Микробиология. – 2017. – Т. 86. №6. – С. 696-702. (Scopus, РИНЦ, ВАК)

6) До Тхи Зуен Влияние рентгеновского излучения на лактобациллы нормальной микрофлоры кишечника человека / Зуен До Тхи, Ж.С. Рычакова, **Е.А. Анисимова**, П.В. Зеленихин, О.Н. Ильинская, С.В. Курочкин, С.А. Рыжкин, Д.Р. Яруллина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т. 57. №3. – Р.257-263. (РИНЦ, ВАК)

Статьи в других изданиях:

1) **Анисимова Е.А.** Выделение, идентификация и отбор антагонистически активных штаммов лактобацилл / Е.А. Анисимова // Сборник научных статей Казанского федерального университета 2015 года: сборник статей / Мин-во образования и науки; Казанский (Приволжский) федеральный ун-т. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – 9-12.

Материалы и тезисы конференций:

1) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность пробиотических лактобацилл: генетические детерминанты и их горизонтальный транспорт / Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина // Актуальная биотехнология. – 2020. – №3 (34). – С. 641-643.

2) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность лактобацилл: генетические детерминанты и их горизонтальный транспорт / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых (Н. Новгород, 28-30 октября 2020 г.) – Н. Новгород: Университет Лобачевского, 2020. – С.12.

3) **Anisimova E.A.** Assessment of antibiotic resistance genes mobility in lactobacilli / E.A. Anisimova, D.R. Yarullina // Interaction: from cell to human: abstract book of the Russian-German Seminar dedicated to the 30th anniversary of partnership agreement between the Justus Liebig University (Giessen) and Kazan (Volga-Region) Federal University Kazan, May 20-24, 2019. – Kazan: Published House of Kazan University, 2019. – P. 31.

4) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность лактобацилл: генетические детерминанты и анализ их мобильности / Е.А. Анисимова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина // «Биотехнологии микроорганизмов»: Материалы международной научно-практической конференции, Минск, 27-29 ноября 2019. – Минск: «Экоперспектива», 2019 – С.238-240.

5) **Анисимова Е.А.** Характеристика антибиотикорезистентности пробиотических штаммов лактобацилл / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // VI Международная конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2019. Сб. тезисов /АНО «Иннов. центр Кольцово» – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. – С. 6-8.

6) **Анисимова Е.А.** Механизмы устойчивости пробиотических лактобацилл к антибиотикам различных классов / Е. А. Анисимова, Д. Р. Яруллина // «Биосистемы: организация, поведение, управление»: Тезисы докладов 72-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 23-26 апреля 2019 г.) – Н. Новгород: Университет Лобачевского, 2019. – С. 28.

7) **Анисимова Е.А.** Анализ антибиотикорезистентности лактобацилл / Е.А. Анисимова // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019. – 1 с.

8) **Анисимова Е.А.** Характеристика устойчивости пробиотических лактобацилл к клинически распространенным антибиотикам / Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина // «Биология – наука XXI века»: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 23-27 апреля 2018 г., Пущино. Сборник тезисов – Пущино: Синхробук, 2018. – С. 275-276.

- 9) **Anisimova E.** Antibiotic resistance of dairy and probiotic lactobacilli and its transfer to pathogenic bacteria / E. Anisimova, N. Bruslik, D. Yarullina // European journal of clinical investigation. – Barcelona, 2018. – V.48. – № S1. – P. 163-164.
- 10) Алкубайли Р. Характеристика антибиотикорезистентности лактобацилл, выделенных из растительного сырья / Р. Алкубайли, **Е.А. Анисимова**, А.М. Харченко, А.С. Волкова, Д.Р. Яруллина // В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2018», 2018. – Казань: Издательство Казан. ун-та. 2018. – С.208.
- 11) Волкова А.С. Методы видовой идентификации лактобацилл / А.С. Волкова, А.А. Арзамасцева, **Е.А. Анисимова**, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Яруллина // Сборник тезисов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2018. – С. 117.
- 12) **Анисимова Е.А.** Бактерии рода *Lactobacillus* как потенциальные доноры антибиотикорезистентности / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // «Биосистемы: организация, поведение, управление»: Тезисы докладов 71-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 17-20 апреля 2018 г.) – Н. Новгород: Университет Лобачевского, 2018. – С. 21.
- 13) **Anisimova A.E.** Antibiotic resistance and its transferability of probiotic *Lactobacillus* strains / E.A. Anisimova, N.L. Bruslik, D.R. Yarullina // «Kazan precision medicine workshop»: Abstract book. – Kazan, September 10-12 2018. – P. 9.
- 14) **Анисимова Е.А.** Характеристика антибиотикорезистентности промышленного штамма *Lactobacillus fermentum* / Е.А. Анисимова, З.И. Исхакова, Д.Р. Яруллина // Сборник тезисов III Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2018. – С.110.
- 15) **Анисимова Е.А.** Оценка вклада пробиотических лактобацилл в распространение генов лекарственной устойчивости в микробиоме человека / Е.А. Анисимова, Р.К. Исмагилова, Д.Р. Яруллина // Микробиология в современной медицине: материалы Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием. – Казань, 23 июня 2017. – С.16-18.
- 16) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность биотехнологически ценных лактобацилл, выделенных из растительного сырья / Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Д.Р. Яруллина // «Биосистемы: организация, поведение, управление»: Тезисы докладов 70-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 26-28 апреля 2017 г.) – Н. Новгород: Университет Лобачевского, 2017. – С.11.
- 17) **Анисимова Е.А.** Пробиотики vs антибиотики: оценка мобильности генов антибиотикорезистентности у пробиотических лактобацилл / Е.А. Анисимова, Исмагилова Р.К. // VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки»: сборник материалов конференции; ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАПО, 2017. Т.1. – С. 49-51.
- 18) **Анисимова Е.А.** Анализ мобильности генов антибиотикорезистентности у пробиотических лактобацилл / Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Ахатова, Р.К. Исмагилова, Д.Р. Яруллина // «Трансляционная медицина»: Сборник тезисов международной конференции (Казань, 13-14 октября 2016 г.). – Казань: «Бриг», 2016. – С.10.
- 19) **Анисимова Е.А.** Анализ мобильности генов антибиотикорезистентности у лактобацилл / Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Ахатова, Р.К. Исмагилова, Д.Р. Яруллина // Сборник тезисов II Международной школы-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2016. – С.10.
- 20) **Анисимова Е.А.** Пробиотические лактобациллы не являются источником распространения генов антибиотикорезистентности в микробиоме человека /

Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Ахатова, Р.К. Исмагилова, А.А. Тойменцева, Д.Р. Яруллина // «Биология – наука XXI века»: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18-22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2016. – С.7.

21) **Анисимова Е.А.** Анализ мобильности генетических детерминант антибиотикорезистентности пробиотических лактобацилл / Е.А. Анисимова, Д.Р. Ахатова, А.С. Потапова, Д.Р. Яруллина // «Молодые ученые – медицине»: Материалы XV научной конференции молодых ученых и специалистов с международным участием: – Владикавказ: ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России: ИПЦ ИП Цопановой А.Ю., 2016. – С.13-16.

22) **Анисимова Е.А.** Антибиотикорезистентность пробиотических лактобацилл: генетические детерминанты и их реализация / Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Ахатова, Р.К. Исмагилова, А.А. Тойменцева, Д.Р. Яруллина // Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»; 11-15 апреля 2016 г.: Москва, МГУ имени Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – С.247.

23) **Анисимова Е.А.** Пробиотические лактобациллы – источник распространения генов антибиотикорезистентности в микробиоме человека / Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Исмагилова // VII Конференция молодых ученых РМАПО с международным участием «Шаг в завтра»; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последиplomного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2016. Т.1. – С.27-29.

24) **Анисимова Е.А.** Оценка риска распространения генов антибиотикорезистентности в микробиоме человека от пробиотических лактобацилл / Е.А. Анисимова, Н.Л. Бруслик, Д.Р. Ахатова, Р.К. Исмагилова, А.А. Тойменцева, Д.Р. Яруллина // Программа и научные труды Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА / Под ред. Е.Н. Ильиной, Е.С. Кострюковой. – М.: ФНКЦ ФХМ ФМБА России, 2016. – С.17-18.

25) **Анисимова Е.А.** Новые антагонистически активные штаммы лактобацилл из растительного материала / Е.А. Анисимова, А.С. Потапова, Д.Р. Яруллина // Ломоносов – 2015. Секция «Биология»: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, 13-17 апреля: тезисы докладов. – Москва: МАКС Пресс, 2015. – С.206-207.

26) **Анисимова Е.А.** Штамм *Lactobacillus plantarum* FCa3L с широким спектром антимикробной активности / Е.А. Анисимова, Д.Р. Яруллина // «Биология – наука XXI века»: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2015. – С. 158.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю диссертационного совета КФУ.03.07. к.б.н., доц. Кравцовой Ольге Александровне, e-mail: okravz@yandex.ru

Е-mail автора: elizaveta-real@mail.ru