

Гены резистентности к антибиотикам микроорганизмов пробиотических препаратов

Полиниченко А.Е.¹, Лановая О. Д.¹, Ажогина Т. Н.¹, Сазыкина М.А.¹, Сазыкин И. С.¹

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия; polinichenko@sfedu.ru

Аннотация

На сегодняшний день пробиотические препараты широко применяются в терапевтических целях в качестве средства для восстановления микрофлоры и нормализации функций ЖКТ, а также в косметической и пищевой промышленности. Популярность пробиотиков, в свою очередь, стимулирует масштабные исследования, направленные на выявление потенциальных рисков, уникальных свойств и подтверждение положительного влияния пробиотических штаммов микроорганизмов на организм человека и животных. В данной работе было количественно определено содержание десяти генов антибиотикорезистентности (АРГ) в десяти известных пробиотических препаратах, принадлежащих к разным поколениям. Наше исследование выявило значительное разнообразие АРГ в исследуемых препаратах, что указывает на потенциальный риск горизонтального переноса АРГ от пробиотических бактерий к патогенной микрофлоре. Количество копий АРГ в образцах можно расположить в следующем порядке по убыванию: *vanB* > *bla*CTX-M > *mphA* > *sul2* > *bla*VIM-1 > *vanA* > *tetO* > *aadA2* > *mecA* > *ermB*. Анализ частоты встречаемости АРГ выявил преобладание генов, детерминирующих устойчивость к стрептомицину (*aadA2*), тетрациклинам (*tetO*), макролидам (*ermB*), а также β-лактамным антибиотикам (*bla*VIM-1). Гены *mphA* и *mecA*, детерминирующие устойчивость к макролидам и метициллину соответственно, демонстрировали наименьшую частоту встречаемости, будучи идентифицированными в 60% исследованных пробиотических препаратов. Указанные гены антибиотикорезистентности были идентифицированы во всех исследованных пробиотических препаратах. Повсеместная доступность пробиотиков, реализуемых безрецептурно и применяемых в различных областях промышленности, вызывает опасения относительно потенциальных рисков, связанных с неконтролируемым воздействием на микробиоту человека и животных.

Ключевые слова: гены антибиотикорезистентности; молочнокислые бактерии; бифидобактерии; пробиотики

Antibiotic resistance genes of microorganisms of probiotic preparations

Polinichenko A.E.¹, Lanovaya O.D.¹, Azhogina T.N.¹, Sazykina M.A.¹, Sazykin I.S.¹

¹ *Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; polinichenko@sfedu.ru*

Abstract

Today, probiotic drugs are widely used for therapeutic purposes as treatment and restoration of gastrointestinal health, as well as in cosmetics and food industries. The popularity of probiotics, in turn, stimulates large-scale research aimed at identifying potential risks, unique properties and confirming positive effects of probiotic strains of microorganisms on human and animal body. In this work, content of 10 antibiotic resistance genes (ARG) in 10 probiotic drugs belonging to different generations was quantified. Our study revealed a significant ARGs diversity in the studied drugs, which indicates the risk of ARGs horizontal transfer from probiotic bacteria to pathogenic microflora. The abundance of ARG copies in the samples decreased in the following order: *vanB* > *bla*CTX-M > *mphA* > *sul2* > *bla*VIM-1 > *vanA* > *tetO* > *aadA2* > *mecA* > *ermB*. The analysis of ARG genes frequency revealed the predominance of genes that determine resistance to streptomycin (*aadA2*), tetracyclines (*tetO*), macrolides (*ermB*), as well as β -lactam antibiotics (*bla*VIM-1). In contrast, the *mphA* (macrolide resistance) and *mecA* (methicillin resistance) genes were the least frequent, detected in 60% of the tested probiotics. The listed ARGs were present in all studied probiotic preparations. Widespread availability of over-the-counter probiotics-used across multiple industries-raises concerns about potential risks linked to uncontrolled effects on human and animal microbiota.

Keywords: antibiotic resistance genes; lactic acid bacteria; bifidobacteria; probiotics

Введение

Собственная микробиота кишечника играет в ключевую роль в поддержании гомеостаза и защите организма от патогенов как на кишечном, так и на внекишечном уровнях, что обуславливает необходимость её сохранения и коррекции (Kho et al., 2018). Одним из наиболее распространенных подходов к поддержанию микробиоты является применение пробиотиков, которые, являясь представителями облигатного микробиома кишечника, демонстрируют широкий спектр полезных свойств для человека и животных. В связи с этим пробиотики нашли применение не только в составе лекарственных препаратов, но также в составе функциональных продуктов питания, косметических средств, биологически активных добавок.

Отбор пробиотических штаммов осуществляется на основе строгих критериев безопасности. Развитие технологий секвенирования генов 16S рРНК и создание современных биоинформационных инструментов способствовало прогрессу в изучении микробиоты кишечника (Jovel et al., 2016). Это приводит к пониманию состава и функций бактериальных популяций кишечника, а также к более подробному исследованию генотипов и их фенотипических проявлений. Бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также некоторые представители родов *Pediococcus*, *Enterobacterium* и *Bacillus* широко используются в качестве пробиотиков и заквасок для промышленных и сельскохозяйственных целей (например, для ферментированных пищевых продуктов и силосных культур), что позволяет увидеть длительную историю безопасного использования. К тому же 5 видов бифидобактерий (*Bifidobacterium spp.*), 33 вида лактобактерий (*Lactobacillus spp.*), а также *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Propionibacterium freudenreichii* и *Streptococcus thermophilus* соответствуют

критериям Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) в отношении квалифицированной презумпции статуса безопасности (QPS). Однако несмотря на многолетнюю историю исследований влияния пробиотиков на здоровье, безопасность перечисленных видов требует постоянного наблюдения. Особое внимание в контексте безопасности пробиотиков следует уделить проблеме антибиотикорезистентности. Поскольку пробиотические препараты часто назначаются совместно с антибиотикотерапией, нерациональное и избыточное применение антибиотиков во всем мире привело к аналогичному, бесконтрольному росту использования пробиотиков (Draper et al., 2017; Yang et al., 2024). Это, в свою очередь, создает условия для потенциального переноса АРГ между микроорганизмами, что может представлять серьёзную угрозу как для здоровья человека, так и для экосистем в целом. В частности, горизонтальный перенос генов устойчивости между пробиотическими штаммами и патогенными или условно-патогенными микроорганизмами может способствовать снижению эффективности антибиотикотерапии и усугублять глобальную проблему антимикробной резистентности. Вследствие этого, целью данной работы является обновление знаний о содержании АРГ в известных пробиотических препаратах.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были выбраны 10 пробиотических препаратов, предназначенных для нормализации кишечной микрофлоры у различных возрастных групп (взрослые и дети). Критериями отбора являлись лекарственная форма (использовались только препараты в капсулах или порошках) и высокая востребованность на рынке пробиотических средств. Использовались препараты с гетерогенными и гомогенными популяциями бактерий. Пробиотические препараты впоследствии обозначаются как А, В, С,

D, E, F, G, H, Y и J. Бактериальный состав каждого из исследуемых пробиотиков представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Бактериальный состав исследуемых пробиотиков

| Обозначение | Состав |
|---------------|--|
| I поколение | |
| A | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| B | <i>Lactobacillus casei rhamnosus Doderleini</i> |
| II поколение | |
| C | <i>Bacillus subtilis 3</i> |
| III поколение | |
| D | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Enterococcus faecium</i> |
| E | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> |
| F | <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| G | <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum bulgaricus</i> <i>Lactobacillus plantarum casei</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| H | <i>Lactobacillus casei PXN37</i> <i>Lactobacillus plantarum PXN47</i> <i>Lactobacillus. rhamnosus PXN54</i> <i>Lactobacillus acidophilus PXN35</i> <i>Lactobacillus bulgaricus PXN39</i> <i>Lactobacillus helveticus PXN45</i> <i>Lactobacillus salivarius PXN57</i> <i>Lactobacillus fermentum PXN44</i> <i>Bifidobacterium bifidum PXN23</i> <i>Bifidobacterium breve PXN25</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium. infantis PXN27</i> <i>Lactococcus lactis spp.</i> <i>Streptococcus thermophilus PXN66</i> |
| Y | <i>Lactobacillus acidophilus LA-5</i> |

| | |
|---|--|
| | <i>Bifidobacterium animalis BB-12</i> |
| J | <i>Lactobacillus acidophilus (La-14)</i> <i>Bifidobacterium lactis (BI-04)</i> <i>Bifidobacterium longum (Bl-05)</i> <i>Lactobacillus rhamnosus (Lr-32)</i> <i>Bifidobacterium breve (Bb-03)</i> <i>Lactobacillus casei (Lc-11)</i> <i>Lactobacillus salivarius (Ls-33)</i> <i>Lactobacillus plantarum (Lp-115)</i> |

Для приготовления рабочих растворов 1,5 г каждого исследуемого препарата ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4). Из полученной суспензии выделяли тотальную ДНК, определяли концентрацию ДНК при помощи флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США), проводили количественный ПЦР анализ в реальном времени (RT-PCR) на наличие АРГ. Для выделения тотальной ДНК использовали фенол-хлороформный метод в присутствии мелющих тел (Sazykin et al., 2019).

Были исследованы десять АРГ, включая гены устойчивости к макролидам (*ermB* и *mphA*), сульфонидами (*sul2*), тетрациклину (*tetO*), карбапенемам (*blaVIM-1*), ванкомицину (*vanA*, *vanB*), аминогликозидам (*aadA2*), метициллину (*mecA*), цефалоспорином и монобактамам (*blaCTX-M*). Нуклеотидная последовательность праймеров приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры и условия для ПЦР

| Название гена | Последовательность нуклеотидов праймеров, 5'-3' | Количество нуклеотидов в ампликоне, п.н. | Условия ПЦР | Ссылка |
|--|---|--|---|---------------------|
| <i>blaVIM-1</i> f <i>blaVIM-1</i> r | ACTGTCGGATACTCACCCTC GTTATGGAGCAGCAACGATGT | 189 | 95°C – 3 min 40 cycles: 94°C – 5 s 57°C – 15 s 72°C – 30s | Tana et al., 2018 |
| <i>vanB</i> f <i>vanB</i> r | AGACATTCGGTCGAGGAAC GCTGTCAATTAGTGCGGGAA | 220 | 94°C – 3 min 35 cycles: 94°C – 60 s | Akanbi et al., 2017 |

| | | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----|---|----------------------------|
| | | | 56,5°C – 60 s 72°C – 60s | |
| <i>tetO</i> f | ATGGCATACAGGCACAGACC | 178 | 95°C – 3 min 35 cycles: 95°C – 30 s 58°C – 40 s 72°C – 30s | Azhogina et al., 2022 |
| <i>tetO</i> r | GGATGCTGCCCAACCTTTTG | | | |
| <i>ermB</i> f | GCATTTAACGACGAAACTGGCT | 123 | 95°C – 3 min 40 cycles: 95°C – 15 s 58°C – 30 s 72°C – 30s | Azhogina et al., 2022 |
| <i>ermB</i> r | TGGTGAATTAAAGTGACACGA ATGT | | | |
| <i>sul2</i> f | TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG | 191 | 95°C – 3 min 35 cycles: 95°C – 30 s 58°C – 40 s 72°C – 30s | Wang et al., 2018 |
| <i>sul2</i> r | CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG | | | |
| <i>mphA</i> f | AGTTCGTGGTGAACGACAAG | 153 | 95°C – 3 min 35 cycles: 94°C – 60 s 58°C – 60 s 72°C – 45s | Szczepanowski et al., 2009 |
| <i>mphA</i> r | AGTCGATCATCCCGCTGAC | | | |
| <i>aadA2</i> f | TAAGACGGGCTGATACTGG | 251 | 95°C – 3 min 40 cycles: 95°C – 10 s 53°C – 30 s 72°C – 30 s | Wang et al., 2017 |
| <i>aadA2</i> r | CATAGCGTTGCCTTGGTAG | | | |
| <i>mecA</i> f | GTGAAGATATACCAAGTGATT | 147 | 95°C – 3 min 40 cycles: 95°C – 15 s 58°C – 30 s 72°C – 30 s | Azhogina et al., 2022 |
| <i>mecA</i> r | ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT | | | |
| <i>bla</i> CTX-M f | ACCAACGATATCGCGGTGAT | 101 | 95°C – 3 min 40 cycles: 95°C – 10 s 58°C – 30 s 72°C – 30 s | Guo et al., 2017 |
| <i>bla</i> CTX-M r | ACATCGCGACGGCTTTCT | | | |
| <i>vanA</i> f | CATGGCAAGTCAGGTGAAGA | 187 | 95°C – 3 min 40 cycles: 95°C – 15 s | Lekunberri et al., 2017 |
| <i>vanA</i> r | CCACCGGCCTATCATCTTT | | | |

| | | | | |
|--|--|--|-------------|--|
| | | | 58°C – 30 s | |
| | | | 72°C – 30 s | |

Для расчета числа копий АРГ и 16S рРНК использовали калибровочную кривую, полученную с использованием 10-кратных серийных разведений (10^2 – 10^8 копий) стандартной плазмиды, содержащей продукт амплификации для каждого праймера. Все количественные анализы проводили в трех независимых повторностях для каждого исследуемого образца. Значения эффективности усиления (R^2) находились в диапазоне от 93 до 110%. Для того, чтобы свести к минимуму различия, связанные с аналитической эффективностью, дифференциальной экстракцией и вариациями фоновых локальных количеств бактериальных генов, в этой работе количество АРГ выражалось как отношение количества АРГ к содержанию гена 16S рРНК.

Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 8.0.2 DEMO (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты ПЦР в реальном времени были нормализованы по содержанию гена 16S рРНК и выражены в виде абсолютного количества копий целевого гена на одну копию гена 16S рРНК. Полученные количественные данные представлены в таблице 3 и на рисунке 1 в виде тепловой карты.

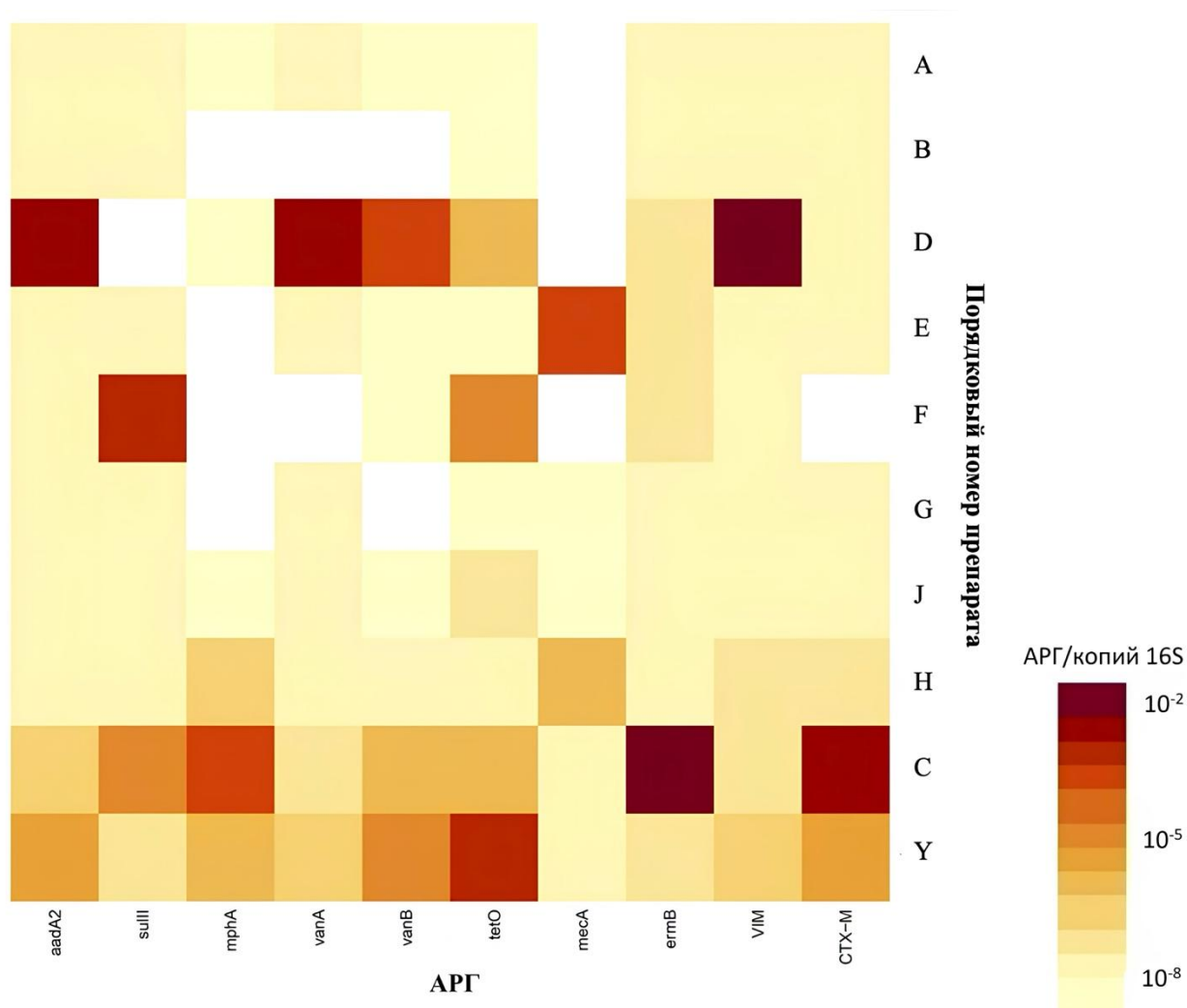


Рис.1 – Содержание генов резистентности в исследуемых пробиотиках

Таблица 3 – Спектр АРГ в исследуемых пробиотических препаратах

| Порядковый номер пробы | <i>blaVIM-1</i> | <i>blaCTX-M</i> | <i>mecA</i> | <i>vanA</i> | <i>vanB</i> | <i>tetO</i> | <i>sul2</i> | <i>ermB</i> | <i>mphA</i> | <i>aadA2</i> |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| А | $7,00 \times 10^{-6}$ | $5,12 \times 10^{-3}$ | – | $7,41 \times 10^{-7}$ | $4,27 \times 10^{-5}$ | $1,07 \times 10^{-6}$ | $6,38 \times 10^{-6}$ | $3,31 \times 10^{-8}$ | $2,43 \times 10^{-6}$ | $2,58 \times 10^{-6}$ |
| В | $8,98 \times 10^{-8}$ | $1,30 \times 10^{-5}$ | – | – | – | $5,40 \times 10^{-5}$ | $4,98 \times 10^{-6}$ | $6,49 \times 10^{-8}$ | – | $1,18 \times 10^{-6}$ |
| С | $1,11 \times 10^{-3}$ | $9,22 \times 10^{-2}$ | $3,81 \times 10^{-6}$ | $1,58 \times 10^{-3}$ | $6,87 \times 10^{-2}$ | $1,02 \times 10^{-3}$ | $8,05 \times 10^{-3}$ | $5,55 \times 10^{-5}$ | $7,12 \times 10^{-2}$ | $3,22 \times 10^{-4}$ |
| Д | $1,16 \times 10^{-2}$ | $4,09 \times 10^{-4}$ | – | $8,81 \times 10^{-3}$ | $1,37 \times 10^{-1}$ | $9,18 \times 10^{-4}$ | – | $6,14 \times 10^{-6}$ | $3,44 \times 10^{-3}$ | $1,47 \times 10^{-3}$ |
| Е | $1,76 \times 10^{-5}$ | $3,40 \times 10^{-4}$ | $2,43 \times 10^{-4}$ | $5,88 \times 10^{-7}$ | $1,41 \times 10^{-4}$ | $1,16 \times 10^{-4}$ | $2,34 \times 10^{-6}$ | $2,56 \times 10^{-6}$ | – | $7,04 \times 10^{-6}$ |
| Ф | $4,07 \times 10^{-7}$ | – | – | – | $9,89 \times 10^{-8}$ | $1,38 \times 10^{-3}$ | $1,25 \times 10^{-2}$ | $3,34 \times 10^{-6}$ | – | $5,17 \times 10^{-7}$ |
| Г | $4,09 \times 10^{-7}$ | $7,74 \times 10^{-3}$ | $2,68 \times 10^{-8}$ | $2,86 \times 10^{-4}$ | – | $5,32 \times 10^{-6}$ | $6,08 \times 10^{-7}$ | $5,02 \times 10^{-8}$ | – | $3,82 \times 10^{-6}$ |
| Н | $1,12 \times 10^{-3}$ | $8,88 \times 10^{-3}$ | $1,10 \times 10^{-4}$ | $1,06 \times 10^{-4}$ | $7,43 \times 10^{-3}$ | $4,09 \times 10^{-4}$ | $1,23 \times 10^{-3}$ | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,36 \times 10^{-2}$ | $6,72 \times 10^{-5}$ |
| У | $2,21 \times 10^{-3}$ | $2,21 \times 10^{-2}$ | $1,88 \times 10^{-5}$ | $2,07 \times 10^{-3}$ | $9,41 \times 10^{-2}$ | $2,23 \times 10^{-3}$ | $2,43 \times 10^{-3}$ | $3,88 \times 10^{-6}$ | $3,84 \times 10^{-2}$ | $7,11 \times 10^{-4}$ |
| Ж | $2,99 \times 10^{-6}$ | $6,04 \times 10^{-4}$ | $2,09 \times 10^{-7}$ | $5,60 \times 10^{-6}$ | $7,21 \times 10^{-6}$ | $6,55 \times 10^{-4}$ | $6,43 \times 10^{-5}$ | $8,65 \times 10^{-7}$ | $4,31 \times 10^{-4}$ | $9,86 \times 10^{-5}$ |

«–» - обозначает, что данный ген не был обнаружен

В 4 из 10 исследуемых пробиотиков обнаружены каждый из 10 исследуемых генов резистентности. К этим пробиотикам относятся С, G, H, и Y. Наиболее ограниченный спектр генов антибиотикорезистентности (6 и 5 из 10 исследуемых) был выявлен в препаратах В и F соответственно. В препарате В обнаружены гены *aadA2*, *sul2*, *tetO*, *ermB*, *blaVIM-1* и *blaCTX-M*, тогда как в препарате F присутствовали *aadA2*, *sul2*, *tetO*, *ermB* и *blaVIM-1*. Однако при этом количество копий некоторых АРГ в F выше среднего значения – к таким генам относятся *sul2* и *tetO*.

Согласно полученным результатам, ген резистентности к 14-членным макролидам *mphA* (встречается в таких препаратах как А, С, D, H, Y и J) и ген резистентности к метициллину *mecA* (С, Е, G, H, Y и J) встречались с наименьшей частотой. Наиболее часто встречающимися генами оказались гены резистентности к стрептомицину *aadA2*, тетрациклинам *tetO*, макролидам *ermB* и β-лактамам антибиотикам *blaVIM-1*. Данные гены были обнаружены в каждом исследуемом пробиотическом препарате.

Количество копий АРГ в образцах можно расположить в следующем порядке по убыванию: *vanB* > *blaCTX-M* > *mphA* > *sul2* > *blaVIM-1* > *vanA* > *tetO* > *aadA2* > *mecA* > *ermB*. Наибольшее содержание *aadA2* найдено в препарате D ($1,47 \times 10^{-3}$ копий/16S рНК). Наибольшее содержание *sul2* обнаружено в препарате F ($1,25 \times 10^{-2}$ копий/16S рНК), *mphA* – в С ($7,12 \times 10^{-2}$ копий/16S рНК), *vanA* и *vanB* – в D ($8,81 \times 10^{-3}$ копий/16S рНК и $1,37 \times 10^{-1}$ копий/16S рНК соответственно), *tetO* – в Y ($2,23 \times 10^{-3}$ копий/16S рНК), *mecA* – в Е ($2,43 \times 10^{-4}$ копий/16S рНК), *ermB* – в С ($5,55 \times 10^{-5}$ копий/16S рНК), *blaVIM-1* – в D ($1,16 \times 10^{-2}$ копий/16S рНК), *blaCTX-M* – в С ($9,22 \times 10^{-2}$ копий/16S рНК). Таким образом, среди всех исследованных образцов наибольшее количество АРГ (4 из 10) было найдено в препарате D: *vanB*, *blaVIM-1*, *vanA* и *aadA2*. В препарате С было выявлено высокое количество копий генов *blaCTX-M* и *ermB*, а препараты F, Y и Е

продемонстрировали пиковые значения по одному из генов: *sul2*, *tetO* и *mecA*, соответственно.

Наибольший спектр АРГ с высоким количественным содержанием отмечен у таких препаратов как С и Y. Также следует отметить, что препараты А и В имеют наименьшее количественное содержание генов резистентности, при этом В к тому же имеет минимальный спектр генов резистентности.

Сообщалось, что устойчивые к ванкомицину фенотипы, возможно, несут наиболее характерные механизмы устойчивости, описанные у представителей рода *Lactobacillus*. При этом резистентность к ванкомицину не является приобретённой, а относится к механизмам природной, наиболее характерной внутренней устойчивости лактобацилл (Goldstein et al., 2015). В таком случае, можно предположить, что большое количество генов *vanA* и *vanB* в D обусловлено присутствием в данном препарате *L. acidophilus* (sp. *L. gasseri*). Аналогично прослеживается взаимосвязь высокого содержания гена устойчивости к аминогликозидам (*aadA2*) в D и присутствием в нём представителя рода *Lactobacillus*. Устойчивость к аминогликозидам была описана как неотъемлемая особенность некоторых видов *Lactobacillus*. Были обнаружены гены нуклеотидилтрансфераз, таких как *ant(6)* и *ant(9)*, которые связывают с устойчивостью лактобацилл к канамицину и стрептомицину в соответствии с высоким сродством *ant(6)* к стрептомицину (Ramirez, Tolmasky, 2010). В ряде исследований говорится о том, что детерминанты устойчивости к тетрациклину *tetM*, *tetS*, *tetW*, *tetO* и *tetQ* являются наиболее часто приобретаемыми генами устойчивости, обнаруженными у лактобацилл (Gueimonde et al., 2013). Это частично согласуется с полученными данными ввиду высокой концентрации гена *tetO* в лактосодержащих пробиотиках Y ($2,23 \times 10^{-3}$ копий/16S рНК), F ($1,38 \times 10^{-3}$ копий/16S рНК) и D ($9,18 \times 10^{-4}$ копий/16S рНК). Предположительно, концентрации генов резистентности к тетрациклину принимают ещё более высокие значения при

рассмотрении всех генов семейства *tet*, поскольку наиболее распространенными генами устойчивости являются *tetM* и *tetS* у пищевых и пробиотических бактерий из-за частой ассоциации *tetM* с конъюгативными транспозонами, такими как Tn 916 (Baumgardner, et al., 2021). Исследования предыдущих лет выявили распространенность устойчивости к эритромицину среди штаммов *Lactobacillus* как дикого, так и промышленного типов. Однако, анализ современных данных свидетельствует о снижении данного показателя, с ограниченным числом случаев, зарегистрированных в отдельных регионах в последние годы, что может быть связано со снижением применения эритромицина (Nunziata et al., 2022).

Согласно данным литературы, род *Lactococcus* проявляет чувствительность ко многим β -лактамным антибиотикам (включая пенициллин, ампициллин, имипенем) и препаратам, активным в отношении грамположительных бактерий (макролиды, тейкопланин, линкомицин и ванкомицин), а также антибиотикам широкого спектра действия, среди которых рифампицин, тетрациклин и хлорамфеникол (Ammor et al., 2007; Khemariya et al., 2013). Вместе с тем описан случай атипичной устойчивости штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из сыров в Китайской Народной Республике. Так, среди исследованных изолятов с множественной устойчивостью 100% были устойчивы к стрептомицину и 91,7% - к сульфаметоксазолу. Гены устойчивости к сульфаниламидам были обнаружены с высокой частотой (Yao et al., 2022). Также показано, что для штаммов *L. lactis* характерна высокая степень вариабельности в отношении устойчивости к эритромицину (Vahabzadeh и Özpinar, 2018). В работе (Tymoszevska et al., 2021) говорится о развитии устойчивости *L. lactis* к рибосомально синтезированным бактериальным токсичным пептидам (бактериоцинам), что потенциально может сделать пробиотики неэффективными в роли микроорганизмов-антагонистов патогенной

микробиоты.

Известно, что пробиотические штаммы рода *Bacillus* обладают специфическими механизмами защиты от антибиотиков, такими как ген устойчивости к аминогликозидам (*aadD2*) и многие гены устойчивости к макролидам, присутствующие на внехромосомных элементах (Galopin et al., 2009). С этими данными согласуются полученные нами результаты по препарату С, который представляет собой лиофилизированные клетки штамма *B. subtilis* 3. В ходе нашего исследования было установлено, что гены *ermB* и *blaCTX-M*, детерминирующие устойчивость к различным классам антибиотиков (*ermB* – к макролидам, линкозамидам и стрептограминам группы В, а *blaCTX-M* – к β -лактамным антибиотикам, включая цефалоспорины III-IV поколений и монобактамы), в наибольшей концентрации обнаружены в образце С. При этом уровень содержания гена *aadA2* (обеспечивающего устойчивость к аминогликозидам) в данном образце составил $3,22 \times 10^{-4}$ копий/16S рРНК (наибольшее полученное значение). Отдельного внимания заслуживает тот факт, что, согласно современным данным, пробиотический штамм *B. subtilis* subsp. *natto* способен ингибировать конъюгативный перенос плазмид между штаммами энтеробактерий, что потенциально может ограничивать распространение антибиотикорезистентности. Так, показано, что *B. subtilis* subsp. *natto* может препятствовать переносу резистентности к ванкомицину в клетки *E. faecalis* (Lin et al., 2021), а добавление бактерий *B. subtilis* в иловый осадок при вермикомпостировании снизило распространенность 32 целевых АРГ, в том числе *sul2*, *ermB* и генов устойчивости к тетрациклину *tetL-02* и *tetX* (НАО et al., 2023).

Исследований, посвящённых АРГ других пробиотических микроорганизмов, значительно меньше. Например, в современной литературе отсутствуют данные о распространённости среди представителей рода

Bifidobacterium большинства исследуемых нами генов резистентности, включая *vanA/vanB*, *mecA*, *blaCTX-M*, *blaVIM-1*, *tphA*, *sul2*, *aadA2* и *ermB*. Исключение составляет лишь ген *tetO*, который изредка выявлялся у бифидобактерий, тогда как существенно чаще у представителей данного рода описаны другие детерминанты тетрациклиновой и макролидной резистентности — *tet(W)*, *tet(M)* и *erm(X)*. Сравнительный полногеномный анализ позволил обнаружить в геномах различных пробиотических штаммов бифидобактерий гены устойчивости к гентамицину, канамицину, метронидазолу, налидиксовой кислоте, неомицину и стрептомицину (Fatahi-Bafghi et al., 2022). Также был обнаружен ген устойчивости к тетрациклину *tetW* у *B. longum*. Согласно результатам наших исследований в препарате А (*B. bifidum*) представленность гена устойчивости к стрептомицину выше относительно других генов устойчивости. Однако в препаратах Н и J, в которых содержится несколько видов бифидобактерий, такой зависимости выявить не удалось, поэтому вопрос АРГ бифидобактерий требует дальнейших исследований.

В работах (Saarela et al., 2000; Sharma et al., 2014) описаны гены бета-лактамаз и эффлюксных помп у представителей рода *Enterococcus*. В нашем исследовании в препарате D, содержащем энтерококки, выявлено относительно большое количество гена *blaVIM-1* и наличие генов *blaCTX-M* и *tetO*. Необходимо отметить, что некоторые авторы (Kerek et al., 2024) рассматривают представителей рода *Enterococcus* как самых опасных пробиотических бактерий в отношении риска передачи АРГ.

Таким образом, полученные данные о спектре и количестве генов резистентности показывают необходимость пересмотра нормативных рекомендаций по оценке безопасности пробиотических штаммов. Было установлено, что некоторые механизмы резистентности широко распространены среди представителей различных родов бактерий. При этом в

работе (Nunziata et al., 2022) были отмечены различия профиля резистентности между дикими и коммерческими штаммами молочнокислых бактерий, не относящихся к энтерококковым. Авторы указывают на то, что количество резистентных диких лактобактерий в сырых молочных продуктах значительно сократилось в результате введения глобальных ограничений на чрезмерное использование антибиотиков в животноводстве. В то же время, несмотря на существующие системы контроля и проверки безопасности коммерческих культур, в последние годы отмечается устойчивая тенденция к увеличению количества генов антибиотикорезистентности в промышленных штаммах микроорганизмов.

Заключение

4 из 10 исследуемых пробиотических препаратов имеют все 10 исследуемых генов резистентности. Наименее часто встречающимися АРГ оказались ген резистентности к 14-членным макролидам (*mphA*) и ген резистентности к метициллину *mecA*. Анализ распределения генов антибиотикорезистентности по препаратам выявил максимальные уровни содержания: для генов *aadA2*, *blaVIM-1*, *vanA* и *vanB* – в препарате D, для генов *ermB*, *mphA* и *blaCTX-M* – в препарате C, для гена *sul2* – в препарате F, для гена *tetO* – в препарате Y и для гена *mecA* – в препарате E.

Устойчивость пробиотических штаммов к антимикробным препаратам представляет собой амбивалентный феномен. С одной стороны, наличие у пробиотиков целевой резистентности к определенным антибиотикам может играть положительную роль, обеспечивая сохранение их жизнеспособности и функциональной активности в условиях антибиотикотерапии. Это способствует поддержанию микробиоценоза кишечника, усиливает конкурентное подавление патогенов и повышает эффективность комбинированного лечения. Кроме того, некоторые пробиотические бактерии могут снижать уровень генов устойчивости к антибиотикам, вмешиваясь в

процессы конъюгационной передачи плазмиды и подавляя чувство кворума. С другой стороны, результаты ряда исследований указывают на наличие у пробиотических штаммов устойчивости к бактериоцинам, соединениям, которые играют ключевую роль в обеспечении антагонистической активности пробиотиков по отношению к патогенным микроорганизмам. Более того, чрезмерное и неконтролируемое применение пробиотических препаратов может нести потенциальную опасность в связи с риском горизонтального переноса АРГ в представителей патогенной микробиоты, что может привести к снижению эффективности антибиотикотерапии и усугублению проблемы распространения антибиотикорезистентности.

Полученные данные согласуются с работами других авторов и свидетельствуют о необходимости систематического пересмотра существующих реестров пробиотических культур, поиска штаммов с минимальным содержанием АРГ и разработки новых стандартов безопасности для пробиотиков.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Финансирование работы – работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2024-0026.

Соблюдение этических стандартов – настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Конфликт интересов – авторы отрицают наличие конфликта интересов.

Список использованной литературы

Патент RU 2696052 C1. C12N 15/10. Способ выделения ДНК из почвы / Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Селиверстова Е. Ю., Хмелевцова Л. Е.; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Южный

Полининченко А. Е., Лановая О. Д., Ажогина Т. Н., Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Гены резистентности к антибиотикам микроорганизмов пробиотических препаратов // «Живые и биокосные системы». – 2025. – № 53; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-53/article-1>; DOI: 10.18522/2308-9709-2025-53-1

- федеральный университет». – № 2018140149; заявл. 13.11.2018; опубл. 30.07.2019. – Бюл. № 22. – 13 с.
- Akanbi O.E., Njom H. A., Fri J., Otigbu A. C., Clarke A.M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2017. – V. 14. – №. 9. – P. 1001.
- Ammor M. S., Flórez A. B., Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria // Food microbiology. – 2007. – V. 24. – №. 6. – P. 559-570.
- Azhogina T., Sazykina M., Konstantinova E., Khmelevtsova L., Minkina T., Antonenko E., Sushkova S., Khammami M., Mandzhieva S., Sazykin I. Bioaccessible PAH influence on distribution of antibiotic resistance genes and soil toxicity of different types of land use // Environmental Science and Pollution Research. – 2022. – V. 30. – № 4. – P. 1-19.
- Baumgardner R. M., Berreta A., Kopper J. J. Evaluation of commercial probiotics for antimicrobial resistance genes // The Canadian Veterinary Journal. – 2021. – V. 62. – №. 4. – P. 379-383.
- Draper K., Ley C., Parsonnet J. Probiotic guidelines and physician practice: a cross-sectional survey and overview of the literature // Beneficial microbes. – 2017. – V. 8. – №. 4. – P. 507-519.
- Fatahi-Bafghi M., Naseri S., Alizehi A. Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2022. – V. 115. – №. 3. – P. 375-389.
- Galopin S., Cattoir V., Leclercq R. A chromosomal chloramphenicol acetyltransferase determinant from a probiotic strain of *Bacillus clausii* // FEMS Microbiology Letters. – 2009. – V. 296. – №. 2. – P. 185-189.
- Goldstein E. J. C., Tyrrell K. L., Citron D. M. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities // Clinical Infectious Diseases. – 2015. – V. 60. – №. suppl_2. – P. S98-S107.
- Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C. G., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria // Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 202.
- Guo X., Yan Z., Zhang Y., Xu W., Kong D., Shan Z., Wang N. Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants // Science of the Total Environment. – 2018. – V. 612. – P. 119-128.
- Hao X., Zhu P., Zhang H., Liang Y., Yin H., Liu H., Bai L., Liu X., Liu H. *Bacillus subtilis* reduces antibiotic resistance genes of animal sludge in vermicomposting by improving heat stress tolerance of *Eisenia foetida* and bacterial community adjustment // Environmental Research. – 2023. – V. 219. – P. 115088.
- Jovel J., Patterson J., Wang W., Hotte N., O'Keefe S., Mitchel T., Perry T., Kao D., Mason A. L., Madsen K. L., Wong G. K. S. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics // Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 459.
- Kerek A., Pelyva-Horváth A., Tóth Á., Kocsis B., Kustos I. Investigating antimicrobial resistance genes in probiotic products for companion animals // Frontiers in Veterinary Science. – 2024. – V. 11. – P. 1464351.
- Khemariya P., Singh S., Nath G., Gulati A. K., Kumar A. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility of nis+ lactococcus lactis from dairy and non-dairy sources // Czech J. Food Sci. – 2013. – V. 31. – №. 4. – P. 323-331.
- Kho Z. Y., Lal S. K. The human gut microbiome—a potential controller of wellness and disease // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 1835.
- Lekunberri I., Villagrasa M., Balcázar J. L., Borrego C. M. Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges // Science of

the Total Environment. – 2017. – V. 601-602. – P. 206-209.

Li H. Y., Zhou D. D., Gan R. Y., Huang S. Y., Zhao C. N., Shang A., Xu X. Y., Li H. B. Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: A narrative review // *Nutrients*. – 2021. – V. 13. – №. 9. – P. 3211.

Lin Y. C., Chen C. C., Hsu C. R., Chen H. Y., Hsieh P. F., Lin Y. T., Wang J. T., Chang H. Y. Probiotic *Bacillus* affects *Enterococcus faecalis* antibiotic resistance transfer by interfering with pheromone signaling cascades // *Applied and environmental microbiology*. – 2021. – V. 87. – №. 13. – P. e00442-21.

Nunziata L., Brasca M., Morandi S., Silveti T. Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* strains of dairy origin: An update // *Food Microbiology*. – 2022. – V. 104. – P. 103999.

Ramirez M. S., Tolmasky M. E. Aminoglycoside modifying enzymes // *Drug resistance updates*. – 2010. – V. 13. – №. 6. – P. 151-171.

Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // *Journal of biotechnology*. – 2000. – V. 84. – №. 3. – P. 197-215.

Sazykin I. S., Seliverstova E. Y., Khmelevtsova L. E., Azhogina T. N., Kudrevskaya E. M., Khammami M. I., Sazykina M. A. Occurrence of antibiotic resistance genes in sewages of Rostov-on-Don and lower Don River // *Theoretical and Applied Ecology*. – 2019. – №. 4. – P. 76-82.

Sharma P., Tomar S. K., Goswami P., Sangwan V., Singh R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics // *Food research international*. – 2014. – V. 57. – P. 176-195.

Szczepanowski R., Linke B., Krahn I., Gartemann K.-H., Gützkow T., Eichler W., Pühler A., Schlüter A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics // *Microbiology*. – 2009. – V. 155. – №. 7. – P. 2306-2319.

Tana L., Lic L., Ashbolta N., Wanga X., Cuia Y., Zhua X., Xua Y., Yanga Y., Maob D., Luoa Y. Arctic Antibiotic Resistance Gene Contamination, A Result of Anthropogenic Activities and Natural Origin // *Science of the Total Environment*. – 2018. – V. 621. – P. 1176-1184.

Tymoszevska A., Diep D. B., Wirtek P., Aleksandrak-Piekarczyk T. *Lactococcus lactis* resistance to aureocin A53-and enterocin L50-like bacteriocins and membrane-targeting peptide antibiotics relies on the YsaCB-KinG-LlrG four-component system // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2021. – V. 65. – №. 12. – P. e00921-21.

Vahabzadeh S., Özpınar H. Investigation of some biochemical properties, antimicrobial activity and antibiotic resistances of kefir supernatants and *Lactococcus lactis ssp. lactis* strains isolated from raw cow milk and cheese samples // *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. – 2018. – V. 24. – №. 3. – P. 407-415.

Wang J., Wang J., Zhao Z., Chen J., Lu H., Liu G., Zhou J., Guan X. PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community // *Environmental Pollution*. – 2017. – V. 231. – №. 2. – P. 1145-1152.

Wang M., Liu P., Xiong W., Zhou Q., Wangxiao J., Zeng Z., Sun Y. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity in simulated manure-soil microcosms // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – V. 147. – P. 817-823.

Yang S., Li Y., Wang J., Zhang H. Prevention and treatment of antibiotics-associated adverse effects through the use of probiotics: A review // *Journal of Advanced Research*. – 2024. – V. 56. – P. 123-145.

Yao J., Li Y., Li P., Xu Z., Li J., Wang L., Yang K. Characterization of bacteria and antibiotic resistance in commercially produced cheeses sold in China // *Journal of Food Protection*. – 2022. – V. 85. – №. 3. – P. 484-493.

Статья поступила в редакцию 1 сентября 2025 г.

Поступила после доработки 3 сентября 2025 г.

Принята к печати 5 сентября 2025 г.

Received September 1, 2025

Revised September 3, 2025

Accepted September 5, 2025