

УДК 579.22; 579.61; 577.112; 547.96; 577.18

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *Lactobacillus* spp. В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *Klebsiella pneumoniae*

© 2018 г. Т. В. Фёдорова^{1*}, Д. В. Васина¹, А. В. Бегунова², И. В. Рожкова²,
Т. А. Раскошная², Н. И. Габриэлян³

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, 115093, Россия

³Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182, Россия

Поступила в редакцию 20.10.2017 г.

В результате скрининга у 3 штаммов молочнокислых бактерий, идентифицированных как *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus helveticus*, обнаружена выраженная антагонистическая активность в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae*, характеризующихся множественной устойчивостью к антибиотикам. При совместном культивировании лактобацилл и штаммов *Klebsiella* ингибирование роста последних составляло от 20 до 86% на первые и вторые сутки соответственно. Анализ экзопротеома штамма *L. rhamnosus* показал, что при совместном культивировании с *Klebsiella pneumoniae* происходила индукция биосинтеза пептидогликан-гидролаз лактобацилл, в том числе внеклеточных литических трансгликозилаз 2 семейства (MltA) и эндопептидаз, разрушающих пептидогликаны клеточной стенки бактерий.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, лактобациллы, антагонистическая активность, пробиотики, *Lactobacillus rhamnosus*, секретом, пептидогликан-гидролазы

DOI: 10.7868/S0555109918030054

В настоящее время во всем мире актуальной является проблема профилактики и лечения нозокомиальных (госпитальных) инфекций. Особого внимания заслуживают нозокомиальные инфекции, вызванные антибиотикорезистентными микроорганизмами. Риск и частота развития госпитальных инфекций во всем мире постоянно увеличиваются [1, 2]. Так, в США проблема распространения резистентных микроорганизмов рассматривается как угроза национальной безопасности. В 2017 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) опубликован список устойчивых к действию антибиотиков бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека [3]. Список разработан в рамках деятельности ВОЗ по борьбе с растущей проблемой устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, и призван стать ориентиром и стимулом для научных исследований в области создания новых антибиотиков.

Грамотрицательные бактерии являются широко распространенной группой микроорганизмов, часто вызывающих тяжелые клинические формы инфекции — пневмонию и сепсис, которые нередко

являются причиной смерти больных. Значение этих микроорганизмов особенно велико при возникновении инфекции в больничных условиях, так как создается вероятность ее внутрибольничного распространения в стационарах различного профиля: хирургических, ожоговых, онкологических, урологических отделениях, отделениях реанимации и интенсивной терапии, отделениях недоношенных новорожденных и др., когда госпитальные штаммы проникают в организм больного и вызывают инфекционный процесс контактно-бытовым, воздушно-капельным путем, через медицинское оборудование и медикаменты. Инфекционные заболевания, вызываемые госпитальными штаммами, нередко трудно поддаются лечению, так как возбудители характеризуются множественной устойчивостью к антибиотикам. Большую опасность представляют грамотрицательные бактерии рода *Klebsiella*. Бактерии рода *Klebsiella* spp. часто обладают множественной антибиотикорезистентностью, при этом детерминанты резистентности циркулируют среди различных штаммов, превращая их в настоящий бич стационаров.

Для эффективного преодоления резистентности возбудителей оппортунистических инфекций и разработки рациональной терапии инфекционных состояний необходим поиск новых антимикробных агентов. Одним из современных направлений в данной области являются исследования антимикробного потенциала пробиотических молочнокислых бактерий [4, 5].

Микроорганизмы рода *Lactobacillus* широко распространены в природе, а некоторые виды являются важнейшими представителями микробиоты человека. Лактобациллы уже давно привлекают внимание ученых с точки зрения возможности их использования для сохранения здоровья населения, профилактики и лечения многих заболеваний различной этиологии [6,7]. Благодаря продукции органических кислот (молочная, уксусная, пропионовая), перекисей и бактериоцинов многие штаммы лактобацилл проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении многих патогенных микроорганизмов [8]. Необходимо получение новых знаний о биологических свойствах лактобацилл для создания пробиотических продуктов и лечебных препаратов на их основе.

Цель работы – изучение антагонистического действия коллекционных штаммов молочнокислых лактобактерий в отношении антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella* spp., возбудителей внутрибольничной инфекции.

МЕТОДИКА

Штаммы бактерий и методы культивирования. Объектами исследования являлись молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, находящиеся в Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва) и штаммы *Klebsiella* spp., предоставленные Федеральным научным центром трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России (Москва).

Штаммы лактобактерий хранились в замороженном состоянии при температуре минус 80 °С в растворе, содержащем 6% обезжиренного сухого молока и 10% глицерина [9]. Восстановление культур лактобактерий проводили в MRS-бульоне и термостатировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч до интенсивного помутнения среды.

Инокуляты лактобактерий и госпитальных штаммов *Klebsiella* spp. получали культивированием в MRS-бульоне при 37 ± 1 °С.

Изучение антагонистической активности молочнокислых лактобактерий. Антагонистическую активность в отношении штаммов *Klebsiella* spp. определяли методом совместного культивирования

в MRS-среде при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ч. Для совместного культивирования штаммов в 20 мл питательной среды MRS вносили по 1 мл инокулята лактобацилл и *Klebsiella* spp. (10⁷–10⁸ КОЕ/мл). Подсчет количества клеток *Klebsiella* spp., выросших в монокультуре на среде СПА (приняты за 100%) и в присутствии лактобактерий проводили через 24 и 48 ч [5].

Идентификация коллекционных штаммов *Lactobacillus* spp. Идентификацию проводили с использованием биохимической тест-системы API 50 CH (bioMerieux SA, Франция) согласно протоколам производителя и молекулярно-генетического метода на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16SpPHK. Культуры выращивали на среде MRS-агар (“bioMerieux SA”, Франция) в анаэробных условиях в течение 2 сут при температуре 37 ± 1 °С.

Для проведения молекулярно-генетической идентификации отбирали одиночные колонии исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, выросшие на MRS-агаре в течение 48 ч при температуре 37 °С. Бактериальные клетки переносили в 1 мл стерильного физиологического раствора, суспендировали и осаждали центрифугированием при 10 000 г в течение 2 мин. Выделение бактериальной ДНК и амплификацию фрагментов генов 16SpPHK с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли по методу, описанному в работе [10]. Для амплификации фрагмента гена 16SpPHK использовали универсальные прокариотические праймеры:

16S-8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и 16S-1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' [11]. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили в лаборатории “Евроген” (Россия) на генетическом анализаторе “ABI PRISM 3100” (“Applied Biosystems”, США). Результаты обрабатывали с помощью программы BioEdit 7.1.3.0. Процедуру множественного выравнивания последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Идентификацию видовой принадлежности осуществляли путем сравнения полученных последовательностей с базой данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (NCBI, США).

Идентификация и определение антибиотикорезистентности внутрибольничных штаммов *Klebsiella* spp. Первичный посев клинического материала проводили на следующие питательные среды: кровяной агар, среда Эндо, маннит-солевой агар, энтерококковый агар, среда Сабуро. Выделение чистой культуры микроорганизмов и окраску по Граму осуществляли в соответствии с [12].

Родовую и видовую принадлежность изучаемых микроорганизмов определяли с помощью бактериологического анализатора Walk Away 96 Plus (“Beckman Coulter”, США) с использованием

панелей MicroScan NBC 44, предусматривающих возможность определения чувствительности к антибактериальным препаратам. Панель включала следующие антибиотики: амикацин, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам, ампициллин, азтреонам, цефазолин, цефепим, цефотаксим, цефотаксим/клавулановая кислота, цефокситин, цефтазидим, цефтазидим/клавулановая кислота, цефтриаксон, цефуроксим, цефалотин, ципрофлоксацин, эртапенем, гентамицин, имипенем (тиенам), левофлоксацин, меропенем, нитрофурантоин, пиперациллин/тазобактам, пиперациллин, тетрациклин, тигециклин (тигацил), тобрамицин, триметоприм/сульфаметоксазол. Используемый анализатор оценивал чувствительность микроорганизма к антибиотикам с указанием ее категории: S – чувствительный, I – промежуточная чувствительность, R – резистентный; МИК – минимальная ингибирующая концентрация (мкг/мл). Определение чувствительности изолятов к полимиксину В и колистину осуществляли на среде Мюллера – Хинтона диско-диффузионным методом [13].

Анализ экзопротеома лактобактерий. Для анализа бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости (КЖ) центрифугированием при 8000 g 40 мин. КЖ концентрировали в 10 раз и одновременно обессоливали с помощью системы ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя мембрану 5 кДа (“Millipore”, США). Белки осаждали смесью ацетон-13.3% трихлоруксусная кислота (ТХУ)– 0.093% β-меркаптоэтанол в соотношении образец: осадитель – 1:1 в течение 12 ч при температуре минус 20°C [14]. Осадок отделяли центрифугированием 20 мин, при 3000 g и дважды промывали 0.07%-ным β-меркаптоэтанолом в ацетоне. Для удаления остатков растворителя осадок подсушивали 5 мин при 20°C в потоке воздуха. Полученный осадок растворяли в лизис-буфере, следующего состава: дитиотреитол – 1% (ДТТ), SAPS – 4%, 7 М мочевины; 2 М тиомочевина; амфолиты – 3/10–5% (“Serva Electrophoresis”, Германия), и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин при 20°C. После обработки реакцию смесь инкубировали в течение 1 ч при 20°C и затем центрифугировали 5 мин при 10 000 g. Супернатант использовали для дальнейших исследований.

Двумерный электрофорез (2-DE) проводили по методике, описанной в работе [15] на системе PROTEAN II xi 2-D Cell (“Bio-Rad”, США). При проведении изоэлектрофокусирования градиент pH – от 3 до 10. Количество образца – 200 мкг белка на трубку. Изофокусирование проводили в течение 16 ч при следующих режимах: 100 В – 45 мин, 200 В – 45 мин, 300 В – 45 мин, 400 В –

45 мин, 500 В – 45 мин, 600 В – 45 мин, 700 В – 10 ч, 900 В – 1.5 ч.

Последующий электрофорез образцов проводили в градиентном акриламидном Na-ДДС-геле (7.5–25%) при напряжении 300 В.

Перед нанесением образцы инкубировали 20 мин в растворе, содержащем: 6 М мочевины, ДДС-Na – 2%, 10 мМ ДТТ, 0.5 М трис-HCl, pH 6.8, для предотвращения окисления сульфгидрильных групп в белках. Для визуального анализа распределения белковых компонентов гели окрашивали азотнокислым серебром. Анализ белковых карт проводили при помощи ПО ImageMaster 2D Platinum, v.7 (“GE Healthcare”, США).

Для масс-спектрометрического анализа проводили трипсинолиз вырезанных из гелей белков в течение 8 ч при 37°C. В качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (“Aldrich”, США) 10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле и 0,5%-ном ТФУ. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (“Bruker”, Германия). Спектры получали в диапазоне масс 700–4500 m/z. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да.

Идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com), используя опцию “пептидный фингерпринт”. Был проведен поиск в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) среди белков всех организмов, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности (score) > 85 в базе данных NCBI считали надежно определенными (p<0.05). С использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 (“Bruker Daltonics”, Германия) проведен поиск по объединенным MS+MS/MS результатам.

Определение содержания органических кислот. Содержание молочной, уксусной и пропионовой кислот анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent Infinity 1290 (США) с детекцией на диодно-матричном детекторе при длине волны 210 нм с использованием колонки Zorbax SB-C8 (4.6 × 50 мм, 1.8 мкм).

Пробы для анализа подготавливали следующим образом: культуральную жидкость после отделения бактериальной биомассы, фильтровали через мембрану с размером пор 5 кДа; к 0.2 мл осветленной культуральной жидкости добавляли 1 мл метанола, встряхивали и осаждали при температуре –18 °C

Таблица 1. Оценка антибиотикорезистентности* изолятов *K. pneumoniae* с использованием панелей MicroScan NBC 44 (R, S, I)

Антибиотик	Изолят <i>K. pneumoniae</i> , № (источник выделения)											
	1 (центральный венозный катетер)		2 (дыхательная трубка)		3 (трахеостома)		4 (моча)		5 (трахеальный катетер)		МИК, МКГ/МЛ	
	результат	МИК, МКГ/МЛ	результат	МИК, МКГ/МЛ	результат	МИК, МКГ/МЛ	результат	МИК, МКГ/МЛ	результат	МИК, МКГ/МЛ		
1 Ампициллин	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16
2 Ампициллин/сульбактам	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	S	</=8/4
3 Амоксициллин/ клавулановая к-га	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	R	> 16/8	S	</=8/4
4 Пиперациллин	R	> 64	R	> 64	R	> 64	R	> 64	R	> 64	R	</=16
5 Пиперациллин/газбактам	R	> 64	R	> 64	R	> 64	R	> 64	R	> 64	S	</=16
Пенициллины												
6 Цефазолин I поколение	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	</=8
7 Цефалотин I поколение	Н/И*	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—
8 Цефуросим II поколение	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16
9 Цефокситин II поколение	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	S	</=8
10 Цефотаксим III поколение	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	32
11 Цефотаксим/клавулановая кислота	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—
12 Цефтазидим III поколение	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	16
13 Цефтазидим/ клавулановая кислота	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—
14 Цефтриаксон III поколение	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32
15 Цефепим IV поколение	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16	R	> 16
Фторхинолоны												
16 Ципрофлоксацин II поколение	R	> 2	R	> 2	R	> 2	R	> 2	R	> 2	S	</=1
17 Левофлоксацин III поколение	R	> 4	R	> 4	R	> 4	R	> 4	R	> 4	S	</=2
Карбапенемы												
18 Меропенем	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	S	</=4
19 Имипенем (Тиенам)	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	S	</=4
20 Эртапенем	R	> 4	R	> 4	R	> 4	R	> 4	R	4	R	> 4
Аминогликозиды												
21 Амикацин	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	R	> 32	S	</=16
22 Гентамицин	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	S	</=4
23 Тобрамицин	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	R	> 8	S	</=4

Антибиотик	Изолят <i>K. pneumoniae</i> , № (источник выделения)									
	1 (центральный венозный катетер)		2 (дыхательная трубка)		3 (трахеостома)		4 (моча)		5 (трахеальный катетер)	
	результат	МИК, МКГ/мл	результат	МИК, МКГ/мл	результат	МИК, МКГ/мл	результат	МИК, МКГ/мл	результат	МИК, МКГ/мл
24	S	—	Н/И	—	Н/И	—	S	—	S	—
25	S	—	Н/И	—	Н/И	—	S	—	S	—
Полимиксины										
26	R	>16	R	>16	R	>16	S	</=8	R	>16
27	Н/И	—	Н/И	—	Н/И	—	R	>64	Н/И	—
28	R	>8	R	>8	R	>8	R	>8	S	</=4
29	I	4	R	>4	I	4	S	</=2	S	</=2
30	R	>2/38	R	>2/38	R	>2/38	R	>2/38	S	</=2/38
N — количество исследованных антибиотиков всего; из них R, S, I**										

* Чувствительность к антибиотикам: S — чувствительный, I — промежуточная чувствительность, R — резистентный. Н/И — не исследован.

в течение 30 мин; осадок отделяли центрифугированием (5 мин, 10 000 g), к 0.2 мл супернатанта добавляли 0.8 мл деионизованной воды. На колонку наносили 10 мкл подготовленной пробы. Элюцию проводили 20 мМ фосфатным буфером, pH 2.0, содержащем 1% ацетонитрил при температуре 35 °С и скорости потока элюента 0.4 мл/мин. В качестве стандартов использовали водные растворы органических кислот (“ACROS”, Бельгия). Время удерживания для молочной, уксусной и пропионовой кислот составляли 2.0, 2.28 и 4.78 мин соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и определение антибиотикорезистентности внутрибольничных штаммов *Klebsiella spp.* В настоящее время отмечается растущая из года в год устойчивость клинических изолятов бактерий — возбудителей нозокомиальных (госпитальных) инфекций, к различным группам антибиотиков [2]. В Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова штаммы *Klebsiella pneumoniae* составляют до 95% всех клинических изолятов *Klebsiella spp.*, выделенных из крови, трахеи, мочи, дренажей и др. в 2016–2017 гг. В дальнейшей работе было использовано пять внутрибольничных изолятов 2016–2017 гг., идентифицированных как *Klebsiella pneumoniae* и характеризующихся множественной устойчивостью к различным группам антибиотиков (табл. 1). Изоляты № 4 и № 5 обладали чувствительностью к карбапенемам (за исключением эртапенема), аминоклизидам, полимиксином и др. Кроме того, изолят № 5 показал чувствительность к защищенным пенициллинам (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавулановая кислота, пиперациллин/тазобактам) и фторхинолонам (табл. 1). Три изолята *Klebsiella pneumoniae* № 1, № 2 и № 3 из пяти, используемых в данной работе, показали устойчивость к антибиотикам следующих групп: пенициллинов, цефалоспоринов, фторхинолонов, карбапенемов и аминогликозидов. При этом изоляты № 1 и № 3 имели промежуточную чувствительность к тигециклину, а изолят № 1 был чувствителен к полимиксином (изолят № 3 к этой группе не исследовали). Основным механизмом устойчивости *K. pneumoniae* к β-лактамам является наличие целого спектра гидролитических ферментов — β-лактамаз, в том числе β-лактамаз с карбапенем-гидролазной активностью, известных как карбапенемазы: металло-β-лактамазы VIM, IMP, NDM типов; сериновые карбапенемазы групп KPC, OXA-48 и GES2/5, гидролизующих пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы [16]. Изоляты № 1 и № 3 проявляли устойчивость ко всем антибиотикам, кроме

Таблица 2. Рост изолятов *K. pneumoniae* в монокультуре и при совместном культивировании с лактобациллами на среде MRS

Время культивирования, ч.	Количество клеток изолята <i>K. pneumoniae</i> , КОЕ/мл									
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5	
	К*	СК**	К	СК	К	СК	К	СК	К	СК
<i>L. acidophilus</i> NK1										
0	$5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$4.5 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$2.7 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
24	$8 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$1 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$7 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$9 \cdot 10^7$	$< 10^3$
48	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^8$	$< 10^2$	$6 \cdot 10^7$	$< 10^2$	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^8$	$< 10^2$
<i>L. reuteri</i> LR1										
0	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$4.5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$2.7 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$
24	$8 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$7 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$9 \cdot 10^7$	$< 10^3$
48	$5 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$2 \cdot 10^8$	$< 10^3$	$3 \cdot 10^8$	$< 10^3$
<i>L. casei</i> Ф										
0	$5 \cdot 10^6$	$3.2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$1.5 \cdot 10^7$	$4.5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$2.7 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^7$
24	$8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^7$	$1.5 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^6$
48	$5 \cdot 10^7$	$< 10^3$	$2 \cdot 10^8$	$< 10^3$	$6 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^3$

*К – контроль, рост штаммов *K. pneumoniae* в монокультуре.

**СК – рост штаммов *K. pneumoniae* при совместном культивировании с лактобактериями. Нумерация изолятов *K. pneumoniae* дана как в табл. 1.

тигециклина и полимиксина (табл. 1), что характерно для продуцентов карбапенемаз NDM-типа, так как данный фермент эффективно гидролизует множество бета-лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. При этом для продуцентов NDM карбапенемаз также характерно наличие ассоциированной устойчивости к антибиотикам других групп (аминогликозидам, фторхинолонам). В 2015 г. описан первый случай выделения (раневая инфекция после открытого перелома голени) штамма *Klebsiella pneumoniae* – продуцента карбапенемазы NDM-1 (установлено наличие гена bla_{NDM-1}). Изолят проявлял устойчивость ко всем бета-лактамам, аминогликозидам и фторхинолонам, но сохранял чувствительность к тигециклину и полимиксину В [17]. Изолят № 2 обладал устойчивостью ко всем протестированным группам антибиотиков (группа полимиксинов для этого изолята не тестировалась). Реальной угрозой в течение последних нескольких лет являются штаммы *K. pneumoniae*, вырабатывающие карбапенемазы ОХА-48-группы [18], данные штаммы *K. pneumoniae* устойчивы почти ко всем известным антибактериальным препаратам и в 40–61% случаев приводят к летальному исходу. Так за последние

три года в Российском онкологическом научном центре отмечено увеличение с 8.6% до 36.1% количества штаммов *K. pneumoniae* ОХА-48 [2].

Таким образом, протестированные в данной работе изоляты *K. pneumoniae*, обладающие множественной устойчивостью к антибиотикам, оставались чувствительными к группе полимиксинов (изоляты № 1 и № 3, изоляты № 2, № 4 и № 5 не тестировались). Однако в 2015 г. был обнаружен новый ген резистентности бактерий к полимиксинам, расположенный на подвижной плазмиде MCR-1, которая посредством конъюгации и активного горизонтального переноса способна быстро распространяться между различными видами бактерий, в том числе неродственными [19]. Продуктом гена MCR-1 является фермент семейства фосфоэтаноламинтрансфераз способный модифицировать липид А путем добавления фосфоэтанолamina, что приводит в свою очередь к снижению отрицательного заряда липополисахарида, расположенного на поверхности грамотрицательных бактерий, и, как результат, препятствует связыванию колистина с мишенью. Наличие генов устойчивости к полимиксинам в сочетании с другими механизмами резистентности делает бактерию

Таблица 3. Биохимическая идентификация коллекционных штаммов *Lactobacillus* spp. с использованием коммерческих наборов API 50 CHL

Род, вид (по паспортным данным)							
Соединение	<i>L.reuteri</i> LR1	<i>L. casei</i> Ф	<i>L. acidophilus</i> NK1	Соединение	<i>L.reuteri</i> LR1	<i>L. casei</i> Ф	<i>L. acidophilus</i> NK1
Глицерин	–	–	–	Салицин	–	+	–
Эритрол	–	–	–	D-целлобиоза	–	+	+
D-арабиноза	–	–	–	D-мальтоза	+	+	+
L-арабиноза	+	–	–	D-лактоза (бычья)	+	+	+
D-рибоза	+	+	–	D-мелибиоза	+	–	–
D-ксилоза	+	–	–	D-сахароза	+	+	+
L-ксилоза	–	–	–	D-трегалоза	–	+	+
D-адонитол	–	–	–	Инулин	–	–	–
Метил-βD-ксилапи- ранозид	–	–	–	D-мелецитоза	–	–	–
D-галактоза	+	+	–	D-раффиноза	+	–	–
D-фруктоза	–	+	+	Гликоген	–	–	–
D-манноза	–	+	+	Ксилит	–	–	–
L-сорбоза	–	+	–	Гентиобиоза	–	+	–
L-рамноза	–	+	–	D-тураноза	–	–	–
Дульцитол	–	+	–	D-ликсоза	–	–	–
Инозит	–	–	–	D-тагатоза	–	+	–
D-маннит	–	+	–	D-фукоза	–	–	–
D-сорбит	–	+	–	L-фукоза	–	–	–
Метил-αD-маннопи- ранозид	–	–	–	D-арабит	–	–	–
Метил-αD-глюкопи- ранозид	–	+	–	L-арабит	–	–	–
N-ацетилпиранозид	–	+	+	Калия глюконат	–	+	–
Амигдалин	–	+	–	Калия 2-кето- глюконат	–	–	–
Арбутин	–	+	–	Калия 5-кето- глюконат	–	–	–
Эскулин железа ци- трат	–	+	–				

устойчивой ко всем существующим сегодня группам антибактериальных препаратов. В связи с чем, в настоящее время активно проводятся работы по поиску новых эффективных в отношении антибиотикорезистентных штаммов бактерий антимикробных агентов. Среди прочего в этом направлении интенсивно изучаются антимикробные свойства пробиотических лактобактерий.

Идентификация и антагонистическая активность лактобактерий рода *Lactobacillus* spp. Проведенный скрининг антагонистической активности молочнокислых бактерий из коллекции

ВНИМИ в отношении антибиотикорезистентных госпитальных изолятов *Klebsiella pneumoniae* (табл. 1) выявил три наиболее активных штамма, относящихся к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, видам *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus casei* в соответствии с паспортными данными (табл. 2). Результаты биохимической идентификации штаммов лактобацилл с использованием тест-системы API 50 CHL показали, что штамм *L. reuteri* LR1 относился к виду *Lactobacillus fermentum*, который по литературным данным считается близким к

Таблица 4. Молекулярно-генетическая идентификация коллекционных штаммов лактобацилл

Штамм (по паспорту)	Родовая и видовая принадлежность, определенная по		Идентификатор в базе Genbank	Идентичность, %
	API 50 CHL	16SpPHK		
<i>L. acidophilus</i> NK1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	FJ845009.1 <i>Lactobacillus helveticus</i> IMAU20111	99
<i>L. reuteri</i> LR1	<i>Lactobacillus fermentum</i> биотип II	<i>Lactobacillus reuteri</i>	NC_009513.1 <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	99
<i>L. casei</i> Ф	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FJ409226.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> MH22	99

L. reuteri [20, 21], штамм *L. casei* Ф к виду *Lactobacillus rhamnosus* [22] и штамм *L. acidophilus* NK1 к виду *Lactobacillus acidophilus* (табл. 3). Поскольку идентификация молочнокислых бактерий только на основании биохимических признаков в настоящее время является недостаточной, ввиду их фенотипической изменчивости под воздействием различных факторов [23], была проведена также

молекулярно-генетическая характеристика выявленных активных штаммов. Данные сравнительного анализа нуклеотидной последовательности генов 16SpPHK с последовательностями 16SpPHK референтных штаммов *Lactobacillus* из базы данных GenBank (NCBI, США) позволили однозначно идентифицировать родовую и видовую принадлежность исследованных штаммов *Lactobacillus* (табл. 4). Результаты биохимической и молекулярно-генетической идентификации штамма *L. rhamnosus* Ф (по паспортным данным *L. casei* Ф) совпадали. В то же время штаммы *L. acidophilus* NK1 и *L. reuteri* LR1, которые были идентифицированы с использованием тест-системы API 50 CHL как *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus fermentum* по гену 16SpPHK отнесены к виду *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus reuteri* соответственно. Это можно объяснить тем, что биохимические профили *L. reuteri* и *L. fermentum* близки друг другу по способности сбраживать арабинозу, рибозу, мальтозу, лактозу, мелибиозу, ксилозу, галактозу, глюкозу и раффинозу, поэтому *L. reuteri* был идентифицирован как *L. fermentum* биотип II. *L. helveticus* и *L. acidophilus* имели также близкую биохимическую активность, а именно по способности к сбраживанию галактозы, глюкозы, фруктозы, маннозы, мальтозы, лактозы и трегалозы.

На рис. 1 представлены результаты по исследованию степени подавления внутрибольничных изолятов *Klebsiella pneumoniae* штаммами лактобацилл. Наиболее выраженной антагонистической активностью по отношению к клебсиеллам обладали штаммы *L. reuteri* LR1 и *L. acidophilus* NK1 (*L. helveticus*). Так через 24 ч сокультивирования степень подавления изолятов госпитальных штаммов клебсиелл варьировала в пределах 56–73% для *L. reuteri* LR1 и 42–73% для *L. acidophilus* NK1 (*L. helveticus*). Штамм *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) показал меньшую степень подавления роста патогена 19–31%. Через 48 ч совместного культивирования подавление роста клеток клебсиелл лактобациллами составило 70–86%, 60–73% и 45–73% для

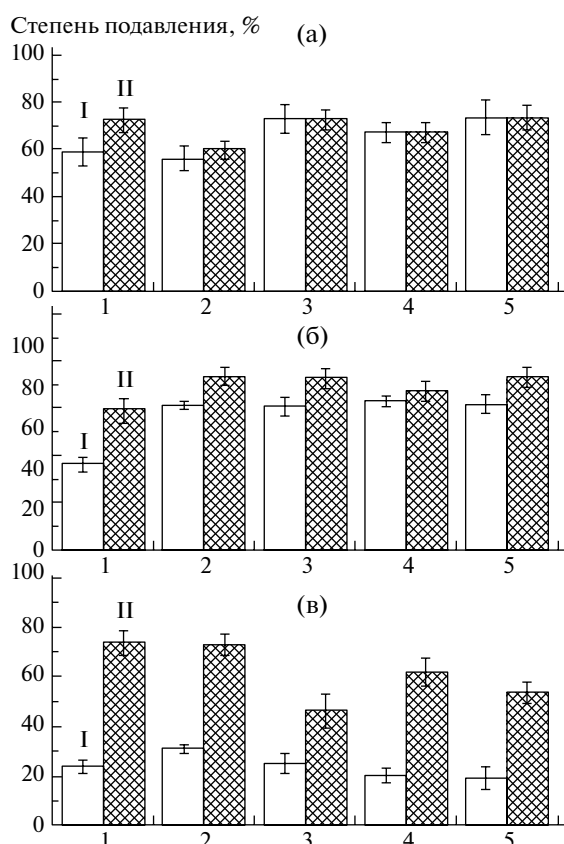


Рис. 1. Подавление роста антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* культурами лактобацилл на 24 (I) и 48 ч (II) совместного культивирования: а – *L. reuteri* LR1; б – *L. acidophilus* NK1; в – *L. casei* Ф. 1–5 – номера изолятов *K. pneumoniae* (как в табл. 1).

штаммов *L. acidophilus* NK1 (*L. helveticus*), *L. reuteri* LR1 и *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) соответственно (рис. 1). Из результатов видно, что после 2 сут культивирования наибольшая степень подавления была отмечена у *L. acidophilus* NK1 (*L. helveticus*). Необходимо также подчеркнуть, что степень подавления роста отдельных изолятов госпитальных штаммов изменялась в зависимости от штамма. Штамм *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) показал более широкую вариабельность в подавлении роста различных изолятов клебсиелл, по сравнению с двумя другими штаммами *Lactobacillus*. Наименьшую активность штамм *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) проявлял в отношении изолятов № 3 и № 5. Наибольший антагонистический эффект *L. reuteri* LR1 показал в отношении изолятов № 1, № 3, № 5 (около 73%), *L. acidophilus* NK1 (*L. helveticus*) – изолятов № 2, № 3, № 5 (около 86%) и *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) – № 1, № 2 (около 73%). Такая избирательность в отношении разных изолятов *K. pneumoniae*, вероятно, может быть обусловлена различиями в адаптационном ответе исследуемых штаммов лактобацилл и соответственно спектре секретируемых ими метаболитов белковой и небелковой природы. Многочисленные протеомные исследования различных видов *Lactobacillus* показали возможные механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды, таким как повышенные температура, кислотность, содержание желчных кислот и солей, а также присутствие в ростовой среде бактерий другого вида или рода [8]. Эти исследования подчеркнули, что в ответ на стресс в дополнение к общим механизмам регуляции, у отдельных штаммов лактобацилл могут включаться и выключаться специфические метаболические пути, изменяя их ответ или ответные реакции и позволяющие приспособляться к изменяющимся условиям, что в свою очередь приводит к качественному и количественному изменению в составе секретомов лактобацилл [24]. Более того разные штаммы бактерий одного и того же вида могут иметь значительно различающийся профиль как поверхностно связанных и интегрированных в клеточную стенку, так и секретируемых белков. Сравнительный протеомный анализ двух хорошо известных пробиотических штаммов *Lactobacillus rhamnosus* GG и Lc705 показал, что штамм GG экспрессирует более 90 уникальных белков, а штамм Lc705 более 150 белков, альтернативных аналогов, которых нет у других штаммов [25].

Сравнительный секретомный (экзопротеомный) анализ *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*). Поскольку именно бактериальный экзопротеом отвечает за гидролиз макромолекул, находящихся в среде, таких как полисахариды и белки, всасывание питательных веществ, связь с другими прокариотическими и эукариотическими клетками и колонизацию

субстратов (в том числе эпителиальных клеток кишечника человека) [26], в работе был проведен сравнительный секретомный (экзопротеомный) анализ штамма *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) при выращивании на MRS-бульоне как монокультуры, так и при совместном культивировании на той же среде с изолятом № 2 *K. pneumoniae* (штамм показал устойчивость ко всем протестированным антибиотикам).

Проведенная биохимическая характеристика коллекционных штаммов показала, что штамм *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) был способен сбрасывать примерно в два раза больше различных сахаров, по сравнению с *L. acidophilus* NK1 и *L. reuteri* LR1 (табл. 3). Действительно, известно, что геномы молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* spp. содержат большое количество генов, участвующих в транспорте и утилизации углеводов [8]. При этом существует высокая как межвидовая, так и внутривидовая вариабельность. Виды лактобацилл с большим размером генома (такие как *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* и *L. rhamnosus*) могут использоваться в качестве субстратов широкий спектр сложных углеводов и, как результат, обладают наибольшей способностью к колонизации, по сравнению с видами, имеющими меньший размер генома и способными утилизировать только простые сахара. Для проведения дальнейших исследований был выбран штамм *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) как более перспективный для использования в качестве пробиотической культуры среди двух других выявленных штаммов лактобацилл, обладающих антагонистической активностью.

В табл. 5 представлены результаты идентификации белковых профилей (экзопротеомов) монокультуры штамма *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) и при совместном культивировании с изолятом № 2 *K. pneumoniae* (штамм с устойчивостью ко всем протестированным антибиотикам) при выращивании на MRS-бульоне в течение 24 ч. Сравнительный анализ состава внеклеточных белков методом двумерного электрофореза показал значительные различия в общей картине распределения белковых компонентов при совместном культивировании с *K. pneumoniae* (табл. 5, рис. 2). Как видно из приведенных результатов, продукция белков характеризовалась изменениями, как на качественном, так и количественном уровнях. В экзопротеоме монокультуры штамма *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) методом масс-спектрометрии был идентифицирован ряд белков, в том числе белки – гомологи глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ, GAPDH): mltA-подобные литические трансгликозилазы и гликозид-гидролазы (эндопептидазы) семейства NlpC/P60 (табл. 5, рис. 2). В присутствии *K. pneumoniae* общее количество белков в экзопротеоме лактобациллы увеличивалось, в том

Таблица 5. Внесклеточные белки, идентифицированные на 2D белковых картах экспропротеомов монокультуры *L. casei* Φ (*L. rhamnosus*) и при совместном культивировании с *K. rleistoniae*

№ белка/ региона на карте*	Мг, кДа/pI, расчетные	Относительная интенсивность, %		№ в базе данных NCBI	Скор	E-value	Гомологичный белок	Организм	Функция
		К	СК						
I	34.0/5.5	6.16	2.48	WP_016364194.1	177	3.3e-11	Глицеральдегид-3-фосфат де- гидрогеназа тип I	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CMG
II	34.0/5.66	1.6	1.4	WP_016364194.1	133	8.2e-07	Глицеральдегид-3-фосфат де- гидрогеназа тип I	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CMG
III	34.0/7.51	0	5.04	WP_016364194.1	133	8.2e-07	Глицеральдегид-3-фосфат де- гидрогеназа тип I	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CMG
IV	30.0/4.43	2.52	2.63	AOW04160.1	197	1.4e-13	Гипотетический белок YALI1_D20676g	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Неизвестна
V	29.0/5.92	1.91	5.13	WP_005711298.1	209	2.1e-14	Пептидаза (Zn-зависимая металлопротеаза семейства M66)	<i>Lactobacillus</i>	PS
VI	26.0/6.59	1.01	5.73	1.WP_005710655.1	178	2.6e-11	Гидролаза, mtA-подобная литическая трансглицозилаза	<i>Lactobacillus</i>	CW-CPs
	24.0/6.99	0	2.31	2.WP_005710655.1	133	8.2e-07	Гидролаза, mtA-подобная литическая трансглицозилаза	<i>Lactobacillus</i>	CW-CPs
	23.0/6.85	1.79	3.29	3.WP_005710655.1	99	0.002	Гидролаза, mtA-подобная литическая трансглицозилаза	<i>Lactobacillus</i>	CW-CPs
VII	11.0/4.24	4.29	3.27	KMO51650.1	99	0.002	Гликозид-гидролаза (эндо- пептидаза NlpC/P60 семей- ства)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CW-CPs
VIII	67.0/6.22	0	1.81	KMO50364.1	95	0.00480	Гликозид гидролаза (эндопептидаза NlpC/P60 се- мейства)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CW-CPs
				WP_064517255.1	92	0.0120	Пептидогликан эндопепти- даза	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CW-CPs

*Соответствует нумерации на рис. 2.

числе расширялся спектр литических трансгликозилаз 2-го семейства (MltA), значительно возросла продукция Zn-зависимой протеазы (в 2.7 раз) и появлялась дополнительная пептидогликан-эндопептидаза (гликозид-гидролаза семейства NlpC/P60). Необходимо отметить, что продукция одного из белков-гомологов GAPDH оставалась неизменной, в то время как интенсивность окраски другого GAPDH уменьшалась в 2.5 раза. При этом появлялся новый белковый компонент, идентифицированный тоже как GAPDH и имевший изоэлектрическую точку в более щелочной области (pI 7.1), вероятно, являющийся другой формой этого фермента. GAPDH является ферментом с мунлайтинг-функцией (moonlighting-ферменты), для которых показана диссоциация с клеточной стенки бактерий в условиях стресса, в том числе при щелочных или кислых pH среды [8]. Механизм изменения места локализации цитозольных белков с мунлайтинг-функцией до конца не ясен.

Таким образом, функциональными группами белков секрета *L. rhamnosus*, продукция которых изменялась в ответ на присутствие клебсиеллы в среде культивирования, были белки углеводного обмена и гликолиза (CMG), протеолитической системы (PS), а также белки клеточной стенки и катаболических процессов (CW-CPs) (табл. 5). Причем, последняя группа была наиболее представленной.

Пептидогликан клеточных стенок постоянно реконструируется во время роста и размножения бактерий под действием множества пептидогликан-гидролаз (PGH), которые вовлечены в такие процессы как отделение дочерних клеток, обновление клеточной стенки и аутолиз в стационарной фазе роста [6]. Ферменты группы PGH также участвуют во многих других процессах, таких как адгезия, образование биопленок, активация dormantных клеток. На основании *in silico* анализа геномов PGH *Lactobacillus* разделены на четыре класса: N-ацетилглюкозаминидазы или мурамидазы; литические трансгликозидазы; N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы и эндопептидазы NLPС/P60 или CNAP семейств. Представленность членов в каждой группе может варьировать у разных лактобацилл. Так в геноме *L. plantarum* WCFS1 среди семейства PGH наиболее многочисленны литические трансгликозилазы, в то время как в геноме *L. reuteri* DSM 20016 – эндопептидазы [6]. PGH имеют модулярную организацию и, по меньшей мере, 7 типов доменов, биологические функции которых неизвестны, обнаружены в дополнение к доменам, отвечающим за связывание с клеточной стенкой (LysM и SH3 домены). Показано изменение уровня продукции литических трансгликозилаз у *L. plantarum* DC400 при сокультивировании с двумя другими лактобациллами

Интенсивность		
№ белка	К	СК
I		
II		
III		
IV		
V		
VI		
VII		
VIII		

Рис. 2. Внеклеточные белки, идентифицированные на 2D белковых картах экзопротеомов монокультуры *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*), при совместном культивировании с *K. pneumoniae* (номерация как в табл. 5)

L. plantarum DPPMA20 и *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 [24]. Интересно, что при сокультивировании *L. plantarum* DC400 с другим штаммом того же вида (*L. plantarum* DPPMA20) содержание трансгликозилаз в секрете уменьшается в 10 раз, в то время как при совместном культивировании

с лактобациллой другого вида (*L. sanfranciscensis* DRPM174) – увеличивается в 2 раза.

Таким образом, можно предположить, что появление в экзосекретоме *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) большого спектра литических трансгликозилаз при сокультивировании с *K. pneumoniae* связано с их способностью лизировать клеточную стенку грамотрицательных клебсиелл подобно лизинам бактериофагов, что может быть одним из возможных механизмов проявления антагонистической активности данного штамма лактобациллы *L. rhamnosus*. Это не исключает и других механизмов, таких как, например, синтез бактериоцинов. Что касается продукции органических кислот, то содержание молочной, уксусной и пропионовой кислот в культуральной жидкости при росте монокультуры *L. casei* Ф (*L. rhamnosus*) было даже чуть меньше, чем при сокультивировании с *K. pneumoniae*: 573, 6993, 1549 мкг/мл для молочной, уксусной и пропионовой кислот соответственно для монокультуры и 236, 5854, 1242 мкг/мл соответственно для смешанной культуры.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094) в части биохимической и антагонистической характеристики лактобацилл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dent L.L., Marshall D.R., Pratap S., Hulette R.B. // BMC Infect Dis. 2010. Т. 10. doi: 10.1186/1471-2334-10-196.
2. Григорьевская З.В., Петухова И.Н., Багирова Н.С., Шильникова И.И., Терещенко И.В., Григорьевский Е.Д., Дмитриева Н.В. // Сибирский онкологический журнал. 2017. Т. 16. № 1. С. 91–97.
3. WHO. Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. 2017. 7 p.
4. Evivie SE., Li B., Ding X., Meng Y., Yu S., Du J., Xu M., Li W., Jin D., Huo G., Liu F. // Front Microbiol. 2017. Т. 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01238
5. Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. // J. Appl. Microbiol. 2014. Т. 117. № 2. С. 518–527. doi:10.1111/jam.12544.
6. Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R.J., Bron P.A. // FEMS Microbiol Rev. 2010. Т. 34. № 2. С. 199–230.
7. Ortiz M.E., Bleckwedel J., Fadda S., Picariello G., Hebert E.M., Raya R.R., Mozzi F. // PLoS One. 2017. Т. 12. № 1. doi: 10.1371/journal.pone.0169441
8. De Angelis M., Calasso M., Cavallo N.M., Di Cagno R., Gobbetti M. // Proteomics. 2016. Т. 16. № 6. С. 946–962. doi:10.1002/pmic.201500117
9. Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Ботина С.Г., Бегунова А.В. // Молочная промышленность. 2015. Т. 12. С. 38–39.
10. Ботина С.Г., Лысенко А.М., Суходолец В.В. // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 520–525.
11. Nietupski R., Stone B.B., Weisburg W.M. // MA, United States Assigned to Amoco Corporation Biotechnology Advances. 1997. Т. 15. № 1. С. 161.
12. Герхард Ф. // М.: Мир. 1984. Т. 3. С. 264.
13. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2004. Т. 6. С. 306–359.
14. Kniemeyer O., Lessing F., Scheibner O., Hertweck C., Brakhage A. // Curr Genet. 2006. Т. 49. С. 178–189. doi:10.1007/s00294-005-0047-9
15. O’Farrell P.H. // J Biol Chem. 1975. V. 250. P. 4007–4021. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.05.005
16. Blair J., Webber M., Baylay A., Ogbolu D., Piddock L. // Nat Rev Microbiol. 2015. Т. 13. С. 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380
17. Shabanova V. V., Krasnova M.V., Bozhkova S.A., Ageevets V.A., Lazareva I.V., Rukina A.N. // Traumatol. Orthop. 2015. Т. 2. № 76. С. 90–98.
18. Poirel L., Potron A., Nordmann P. // J. Antimicrob Chemother. 2012. Т. 67. № 7. С. 1597–1606. doi: 10.1093/jac/dks121
19. Liu Y., Wang Y., Walsh T., Yi L., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu Lin-Feng, Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu Jian-Hua, Shen J. // Lancet Infect Dis. 2016. Т. 16. № 2. P. 161–168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
20. Morita H., Toh H., Fukuda S., Horikawa H., Oshima K., Suzuki T., Murakami M., Hisamatsu S., Kato Y., Takizawa T., Fukuoka H., Yoshimura T., Itoh R., O’Sullivan D.J., McKay L.L., Ohno H., Kikuchi J., Masaoka T., Hattori M. // DNA Res. 2008. Т. 15. № 3. С. 151–161. doi:10.1093/dnares/dsn009
21. Dellaglio F. // International Dairy Federation. Fermented Milk. 2003. № 0301. С. 34–54.
22. Douillard F.P., Ribbera A., Järvinen H.M., Kant R., Pietilä T.E., Randazzo C., Paulin L., Laine P.K., Caggia C., Ossowski I., Reunanen J., Satokari R., Salminen S., Palva A., de Voscor W.M. // Appl. Environ Microbiol. 2013. Т. 79. № 6. С. 1923–1933.
23. Moraes P.M., Perin L.M., Júnior A.S., Nero L.A. // Braz. J Microbiol. 2013. Т. 44 № 1. С. 109–112.

24. Calasso M., Di Cagno R., De Angelis M., Campanella D., Minervini F., Gobbetti M. // Appl. Environ Microbiol. 2013. T. 79. № 8. C. 2657–2669. J. Proteome Res. 2011. T. 10. № 8. C. 3460–3473. doi: dx.doi.org/10.1021/pr2000896.
25. Savijoki K., Lietzen N., Kankainen M., Alatossava T., Koskenniemi K., Varmanen P., Nyman T.A. // 26. Zhou M., Theunissen D., Wels M., Siezen R.J. // BMC Genomics. 2010. T. 11. doi: 10.1186/1471-2164-11-651.

Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp. in Relation to Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*

T. V. Fedorova^{1,*}, D. V. Vasina¹, A. V. Begunova², I.V. Rozhkova², T. A. Raskoshnaya², N. I. Gabrielyan³

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²All-Russia Research Institute of Dairy Industry, Moscow, 115093 Russia

³Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Received October 20, 2017

Screening of 3 strains of lactic acid bacteria identified as *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus helveticus* showed significant antagonistic activity against *Klebsiella pneumoniae* strains characterized by multiple antibiotic resistance. The co-cultivation of lactobacilli with *Klebsiella* strains inhibited growth of the latter from 20 to 86% on the first and second days, respectively. Exoproteome analysis of the *L. rhamnosus* during the *K. pneumoniae* co-culture showed the induction of peptidoglycan hydrolases, including extracellular lytic transglycosylases family II (MltA) and endopeptidases capable of disrupting bacterial cell wall peptidoglycans.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, antagonistic activity, probiotics, *Lactobacillus rhamnosus*, secretome, peptidoglycan hydrolases