

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2022.

Содержание

Болезни и возбудители

Синяев А.А., Гриненко А.О., Попова М.О., Рогачева Ю.А., Спиридонова А.А., Власова Ю.Ю., Смирнова А.Г., Морозова Е.В., Лепик К.В., Михайлова Н.Б., Владовская М.Д., Бондаренко С.Н., Моисеев И.С., Кулагин А.Д.

196 Новая коронавирусная инфекция у реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

202 Федотов В.Д., Жестков А.В., Лямин А.В., Заславская М.И., Добротина И.С., Туличев А.А. Микробиом, обострение и прогрессирование ХОБЛ: есть ли выход?

213 Ткачев П.В., Гончаров А.Е., Дмитриев А.В. Умеренные бактериофаги энтерококков: генетические особенности и практическое применение

Антимикробные препараты

220 Захаренков И.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Белькова Ю.А. Потребление системных антибиотиков в России в 2017–2021 гг.: основные тенденции

226 Кароли Н.А., Ребров А.П. Некоторые проблемы, связанные с безопасностью антибактериальной терапии у больных COVID-19

Антибиотикорезистентность

236 Павлова А.С., Егорова А.Е., Крутова Н.Е., Саенко С.С., Михайлова Ю.В., Гусева А.Н., Чеботарь И.В., Подколзин А.Т., Кулешов К.В., Акимкин В.Г. Распространенность и характеристика БЛРС-продуцирующих штаммов *Salmonella enterica*, циркулирующих на территории России (2016–2020 гг.)

248 Позднякова-Филатова И.Ю., Загоскин А.А., Захарова М.В., Нагорных М.О. Анализ генов, кодирующих белки семейства МБЛ-подобных металлопротеиназ, штамма-деструктора компонентов нефти *Pseudomonas putida* BS3701

Микробиологическая диагностика

254 Азизов И.С., Мартинович А.А. Выявление *mcg-1*-опосредованной резистентности к полимиксинам у бактерий порядка *Enterobacteriales* методом нанесения хелаторов на диск с колистином

Опыт работы

261 Андреев С.С., Рязанцева Е.В., Мальцева Н.П., Мутовина З.Ю., Фомина Д.С., Лысенко М.А. Инфекционный эндокардит, вызванный *Corynebacterium amycolatum*, у пациента с COVID-19 тяжелого течения: описание клинического случая

268 Гординская Н.А., Борискина Е.В., Кряжев Д.В. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* в стационарах Нижнего Новгорода

274 Стрелкова Д.А., Рачина С.А., Кулешов В.Г., Бурмистрова Е.Н., Сычев И.Н., Ананичева Н.А., Васильева Ю.Ю., Чуркина Е.А. Микробиологический мониторинг пациентов с COVID-19 в ОРИТ: проспективное наблюдательное исследование

283 Гордина Е.М., Божкова С.А., Смирнова Л.Н. Влияние бактериофагов на биопленки *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией

Анализ генов, кодирующих белки семейства МБЛ-подобных металлогидролаз, штамма-деструктора компонентов нефти *Pseudomonas putida* BS3701

Позднякова-Филатова И.Ю.¹, Загоскин А.А.¹, Захарова М.В.¹, Нагорных М.О.^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, Россия

² АНО ВО «Научно-технологический университет „Сириус“», Сочи, Россия

Контактный адрес:

Максим Олегович Нагорных
Эл. почта: mz412@rambler.ru

Ключевые слова: резистентность, гены металло-бета-лактамаз, *P. putida* BS3701.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Определить потенциальную возможность штамма *Pseudomonas putida* BS3701 быть источником генов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

Материалы и методы. Последовательности 7 генов, аннотированных как «MBL-fold metallohydrolase superfamily», были проанализированы с использованием следующих ресурсов: ResFinder 4.1, ClustalW, IQ-TREE, iTOL. Подбор олигонуклеотидов для проведения ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием ресурса Primer-BLAST. Уровень экспрессии генов оценивали с использованием ПЦР в реальном времени. Определение МПК и МБК проводили с использованием цефепима и меропенема. Для определения присутствия металло-бета-лактамаз (МБЛ) у штамма использовали метод двойных дисков с ЭДТА.

Результаты. Анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых генов выявил, что все они не входят в кладу, содержащую последовательности МБЛ. В экспоненциальной фазе роста были обнаружены мРНК, соответствующие исследуемым белкам. Определение МПК и МБК выявило низкий уровень резистентности штамма к цефепиму и меропенему. Фенотипический тест дал отрицательный результат на наличие МБЛ у штамма *P. putida* BS3701.

Выводы. Группа белков, которая была аннотирована как «MBL-fold metallohydrolase superfamily» штамма *P. putida* BS3701, не может быть отнесена к МБЛ. Штамм *P. putida* BS3701 не представляет опасности в качестве источника генов устойчивости к соответствующим антибиотикам и может использоваться в биотехнологических задачах.

Original Article

Analysis of the genes encoding the MBL-fold metallohydrolase superfamily proteins of the *Pseudomonas putida* BS3701 petroleum component-degrading strain

Pozdnyakova-Filatova I.Yu.¹, Zagoskin A.A.¹, Zakharova M.V.¹, Nagornykh M.O.^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

Contacts:

Maxim O. Nagornykh
E-mail: mz412@rambler.ru

Key words: resistance, metallo-β-lactamase genes, *P. putida* BS3701.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To determine whether the genes whose products are annotated as "MBL-fold metallohydrolase superfamily" are related to the proteins of the metallo-β-lactamase group.

Materials and methods. Sequences of the 7 genes annotated as "MBL-fold metallohydrolase superfamily" were analyzed using the following resources: ClustalW, IQ-TREE, iTOL. Selection of the oligonucleotides for real-time PCR was performed using the Primer-BLAST resource. The level of gene expression was assessed using real-time PCR. MIC and MBC measuring was performed using cefepime and meropenem. The double-disc method with EDTA was used to determine the presence of MBL in the strain.

Results. Analysis of the nucleotide sequences of the studied genes revealed that all of them were not included in the clade containing sequences of metallo-β-lactamase. In the exponential growth phase, mRNAs corresponding to the studied proteins were found. Determination of MIC and MBC revealed a low level of resistance to antibiotics of the β-lactamase group. The phenotypic test was negative for MBL in *P. putida* strain BS3701.

Conclusions. The investigated genes and corresponding proteins are not related to metallo-β-lactamases. They are not involved in the resistance of *P. putida* BS3701 to antibiotics of the metallo-β-lactamase group.

Введение

Металло-бета-лактамазы (МБЛ) – цинк-зависимые ферменты, которые гидролизуют карбапенемы, пенициллины и цефалоспорины. МБЛ относят к классу В в соответствии с классификацией Амлера, которая основана на аминокислотной последовательности бета-лактамаз [1, 2], и разделяют на 3 подкласса (В1, В2, В3), что позволяет учесть структуру металлосвязывающего домена [3]. МБЛ, наряду с АНЛ-лактоназами, рибонуклеазами и некоторыми другими металл-зависимыми ферментами, входят с суперсемейство металло-гидролаз/оксидоредуктаз [4, 5].

Гены, кодирующие МБЛ, обнаруживают и в представителях рода *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. jureticus*, *P. asiatica* [3]. Штаммы *P. putida* активно применяются в биотехнологии как в составе биопрепаратов для очистки почв от загрязнений ксенобиотиками, так и в виде штаммов-продуцентов ценных метаболитов [6], что делает важным анализ используемых штаммов на наличие генов антибиотикорезистентности. Однако до настоящего времени гены МБЛ *P. putida* искали только среди внутрибольничных штаммов [7–10]. В геноме штамма-деструктора компонентов нефти *P. putida* BS3701 [11] аннотировано 7 генов, кодирующих белки семейства МБЛ-подобных металлогидролаз: 6 из них имеют хромосомную локализацию, 1 имеет плазмидную локализацию [12].

Цель этой работы – определить, являются ли гены, продукты которых аннотированы как «MBL-fold metallohydrolase superfamily», генами, кодирующими МБЛ, с активностью которых ассоциирована повышенная устойчивость псевдомонад к широкому спектру бета-лактамовых антибиотиков.

Материалы и методы

Биоинформатический анализ генов

Поиск в геноме штамма *P. putida* BS3701 генов, ассоциированных с генами устойчивости к антибиотикам, проводили с помощью сервиса ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>). Для построения филогенетического дерева были взяты 7 аминокислотных последовательностей белков *P. putida* BS3701 и 387 аминокислотных последовательности белков, относящихся к MBL-fold metallohydrolase superfamily [3]. Выравнивание проводили с помощью алгоритма ClustalW со стандартными настройками на сайте (www.genome.jp/tools-bin/clustalw). Для расчета использовали сервер IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>), предложенная алгоритмом модель замен WAG+G4. Для визуализации филогенетического дерева использовали iTOL (<https://itol.embl.de/>) [13].

Определение минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций антибиотика

Ночную культуру *P. putida* BS3701 и *P. putida* KT2442 выращивали на богатой среде lysogeny broth (LB) в течение 24 ч., после чего заражали пробирки с 10 мл LB, содержащей антибиотик (конечная концентрация клеток

после инокуляции составила 10^6 КОЕ/мл). Культуру выращивали до стационарной фазы роста (16 ч.) и определяли ОП₅₉₅. Те образцы, где ОП не отличалась от контроля, сеяли на чашки Петри со средой LB без добавления антибиотика (10 мкл на чашку). Минимальной подавляющей концентрацией (МПК) считали минимальную концентрацию антибиотика, при которой отсутствовал рост культуры. Через 16 ч. оценивали численность и ту концентрацию, при которой отсутствовали колонии на чашке, считали минимальной бактерицидной концентрацией (МБК).

Метод двойных дисков с ЭДТА

Взвесь клеток штамма *P. putida* BS3701 наносили на поверхность агаризованной среды. Через 5–10 мин. наносили диск с ЭДТА (5 мкл 0,5 М). На расстоянии 15 мм наносили диск с меропенемом (10 мкг). Для контроля использовали пустой диск. Чашки инкубировали в термостате 16–18 ч.

Выделение тотальной РНК

Ночную культуру *P. putida* BS3701 выращивали на богатой среде LB в течение 24 ч., после чего заражали пробирки с 10 мл LB без добавления антибиотика (конечная концентрация клеток после инокуляции составила 10^6 КОЕ/мл). Через 4 ч., когда культура находилась в экспоненциальной фазе роста, добавляли 5% спиртовой раствор фенола и собирали биомассу. Для выделения тотальной РНК использовали TRI Reagent (Sigma Aldrich, США). Качество препаратов проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Подбор праймеров для количественной ПЦР

Специфические праймеры к генам, кодирующим белки семейства МБЛ-подобных металлогидролаз, и к референсному гену *groS* подбирали с помощью инструмента Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Эффективность амплификации определяли, используя серию десятикратных разведений ДНК-матрицы, специфичность реакции подтверждали с помощью электрофореза в агарозном геле (Таблица 1).

Количественная ПЦР

Перед проведением количественной ПЦР препараты тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I (NEB, США). Для синтеза кДНК брали 100 нг обработанного препарата тотальной РНК и праймеры random hexamer, реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора «Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения количественной ПЦР использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Наличие мРНК определяли по разнице между С_р в образце, обработанном обратной транскриптазой, и в образце без обработки:

$$(1/E^{(C_{\text{р}}-RT)_{\text{с}}-C_{\text{р}}+RT_{\text{к}}}) \times 100\% < 3\%$$

Таблица 1. Информация о праймерах, используемых в количественной ПЦР с обратной транскрипцией

Продукт гена (protein_id)	Последовательность праймеров	Размер ампликона	E	R ²
WP_180689417.1	MBL1_BS3701_rt_299_f TGGAAGACGCCTACAAGCTG MBL1_BS3701_rt_499_r GCTGGATATCGCACTCGACA	201	2,00	0,991
WP_004374564.1	MBL2_BS3701_rt_332_f ATCGCCACGGTACTCCAAG MBL2_BS3701_rt_438_r GGTCACCTGATGTAACGCCA	107	2,00	0,994
WP_180688401.1	MBL3_BS3701_rt_774_f ACGCGTTACCTTTGCTCAGA MBL3_BS3701_rt_1016_r CCAGGAGAGCGGTGAACAAT	243	1,90	0,981
WP_003254735.1	MBL4_BS3701_rt_638_f GCAGCAAGAACAACCTGCCA MBL4_BS3701_rt_715_R CCGTGTTCTGATTCCGCCAC	78	2,10	0,957
WP_004575872.1	MBL5_BS3701_rt_26_f TCCGCGAAACCTTCCCTGTC MBL5_BS3701_rt_283_R TGTCACACAGCATCTGGTCG	258	2,10	0,875
WP_020192714.1	MBL6_BS3701_rt_167_f TGGTCGAGCGTGTGAATGAA MBL6_BS3701_rt_264_r TTCTTCAGGTAGGCAGCGG	98	2,10	0,989
WP_062378634.1	MBL7_BS3701_rt_118_f CCGGGCTTCTATCGCATGAT MBL7_BS3701_rt_329_r CCCCTGTGCGATGAGGATGAG	212	2,10	0,999
RpoS	rpoS(BS3701)RT861f AGGGCATGAAAGCAGTACCC rpoS(BS3701)RT967r GGATCTCACGCAAACGCTTC	107	1,95	0,978

где E – эффективность амплификации при использовании конкретной пары праймеров, Ср«-RT» – цикл для образца без обработки обратной транскриптазой, Ср«+RT» – цикл для образца, обработанного обратной транскриптазой.

Результаты

На начальном этапе нами был использован сетевой ресурс ResFinder 4.1 для поиска в геноме штамма *P. putida* BS3701 генов, ассоциированных с генами устойчивости к антибиотикам. Было установлено, что геном не содержит гены, которые можно отнести к одному из известных генов МБЛ.

МБЛ разделяют на 3 подкласса (B1, B2, B3) и отмечают, что аминокислотные последовательности белков подклассов B1 и B2 гораздо больше похожи друг на друга, чем каждый из них на белки подкласса B3 [5]. Далее мы проанализировали 394 аминокислотных последовательности, относящихся к семейству МБЛ-подобных металлопротеиназ, среди которых было 7 последовательностей МБЛ подкласса B1, 19 – подкласса B2, 4 – подкласса B3. Каждая группа последовательностей белков подкласса B1 и B3 образовывали по одной монофилетической группе, в то время как для последовательностей подкласса B2 наблюдали образование парафилетической группы (Рисунок 1).

В геноме *P. putida* BS3701 аннотировали 7 генов, относящихся к семейству МБЛ-подобных металлопротеиназ: 6 из них имели хромосомную локализацию, 1 – плазмидную локализацию (Таблица 2).

Белки WP_020192714.1 (32,7 кДа, ген имеет хромосомную локализацию) и WP_004575872.1 (23,6 кДа, ген имеет хромосомную локализацию) штамма *P. putida* BS3701 образуют одну кладу с белками (бутстреп-поддержка 96%): P64262 Uncharacterized protein Mb2612c

Таблица 2. Гены, кодирующие белки семейства МБЛ-подобных металлопротеиназ, обнаруженные в штамме *P. putida* BS3701

locus_tag	Локализация	Размер продукта, кДа	protein_id
H0H12_RS06565	хромосома	51,7	WP_180689417.1
H0H12_RS14840	хромосома	50,2	WP_004374564.1
H0H12_RS18960	хромосома	39,8	WP_180688401.1
H0H12_RS22595	хромосома	27,8	WP_003254735.1
H0H12_RS24960	хромосома	23,6	WP_004575872.1
H0H12_RS28800	хромосома	32,7	WP_020192714.1
H0H12_RS29075	плазида	34,7	WP_062378634.1

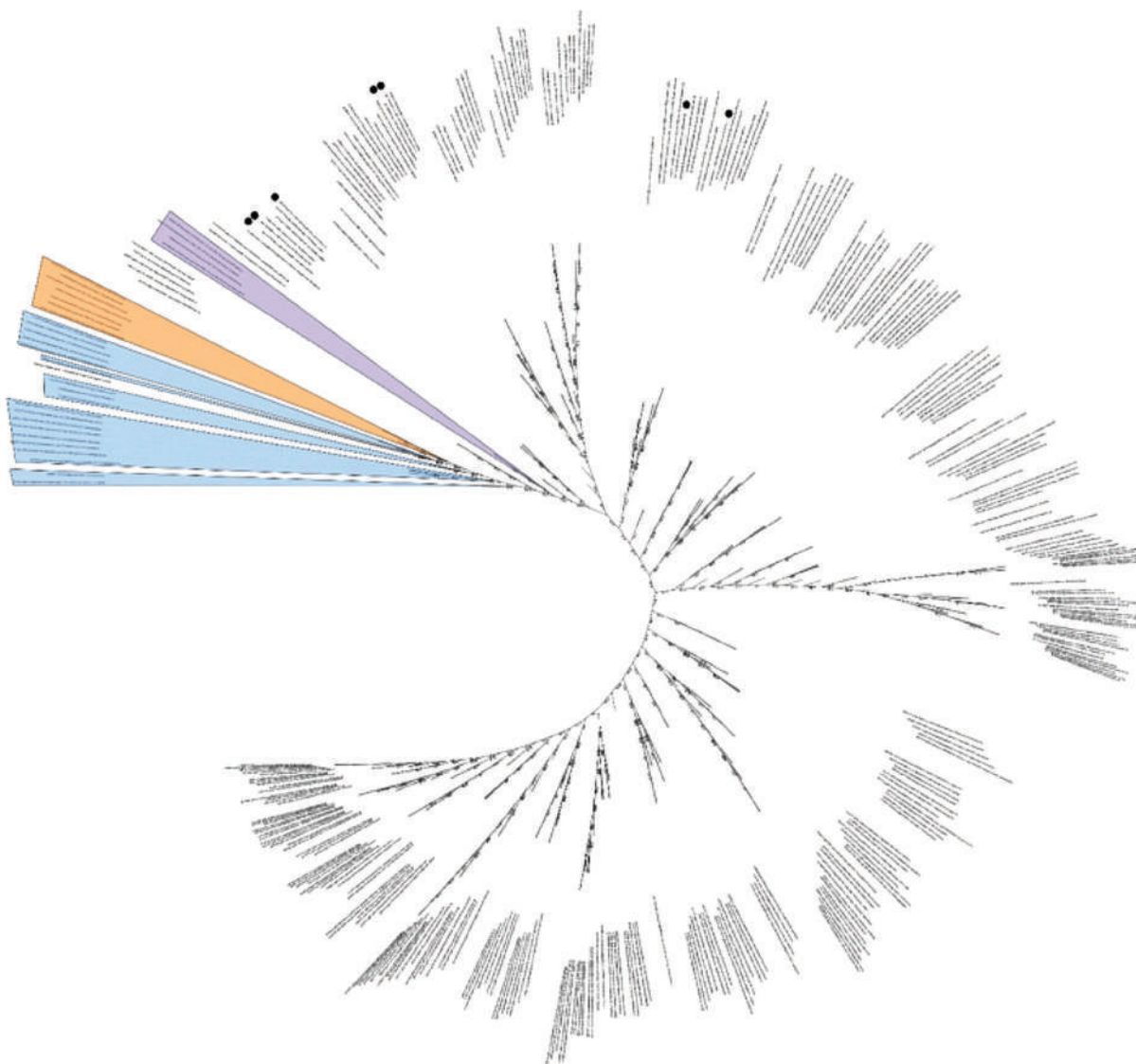


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное по 394 аминокислотным последовательностям белков, принадлежащим к MBL-fold metallohydrolase superfamily

Оранжевой заливкой отмечены МБЛ подкласса В1 (бутстреп-поддержка 98,3%), голубой – подкласса В2, фиолетовой – подкласса В3 (бутстреп-поддержка 92%). Белки MBL-fold metallohydrolase superfamily *P. putida* BS3701 отмечены точками. Длина ветвей проигнорирована.

Mycobacterium bovis, P9WMW2 Uncharacterized protein MT2658 *Mycobacterium tuberculosis*, Q49649 Uncharacterized protein ML0493 *Mycobacterium leprae*, O67893 Uncharacterized protein aq 2135 *Aquifex aeolicus*, P75849 gloC Hydroxyacylglutathione hydrolase *Escherichia coli*, Q57544 Hydroxyacylglutathione hydrolase GloC *Haemophilus influenzae*, P54501 Probable metallo-hydrolase YqgX *Bacillus subtilis*, Q5XD24 Probable metallo-hydrolase M6 Spy0554 *Streptococcus pyogenes* serotype M6, Q87AD6 blh Beta-lactamase hydrolase-like protein *Xylella fastidiosa*, Q9PFB0 blh Beta-lactamase hydrolase-like protein *Xylella fastidiosa*, Q8UAA9 blh Beta-lactamase hydrolase-like protein *Agrobacterium fabrum*, Q3JRV4 Probable metallo-hydrolase BURPS1710b 2304

Burkholderia pseudomallei, A7Z4X7 baeB Probable polyketide biosynthesis zinc-dependent hydrolase *Bacillus velezensis*, O34769 Probable polyketide biosynthesis zinc-dependent hydrolase PksB *Bacillus subtilis*.

Белки WP_004374564.1 (50,2 кДа, ген имеет хромосомную локализацию) и WP_180689417.1 (51,7 кДа, ген имеет хромосомную локализацию) штамма *P. putida* BS3701 образуют одну кладу с белками (бутстреп-поддержка 87,2%): B9JPK6 N-acyl homoserine lactonase AiiB *Agrobacterium radiobacter*, A9CKY2 aiiB N-acyl homoserine lactonase *Agrobacterium fabrum*, Q5SLP1 Ribonuclease TTHA0252 *Thermus thermophilus*, Q7B8C5 aiiA N-acyl homoserine lactonase *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, Q7B8C3 aiiA

Таблица 3. МПК и МБК меропенема и цефепима

Антибиотик	МПК, мкг/мл	МБК, мкг/мл
Цефепим	2	256
Меропенем	8	64

N-acyl homoserine lactonase *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*, Q08GP4 Y2-aiiA N-acyl homoserine lactonase *Bacillus cereus*, Q9L8R8 aiiA N-acyl homoserine lactonase *Bacillus* spp., P9WLD6 Probable metallo-hydrolase MT2357 *Mycobacterium tuberculosis*, P64982 Probable metallo-hydrolase Mb2322c *Mycobacterium bovis*, Q1M813 N-acyl homoserine lactonase AttM *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, A8IQD2 N-acyl homoserine lactonase AttM *Azorhizobium caulinodans*, Q8VPD5 N-acyl homoserine lactonase AttM *Rhizobium radiobacter*, Q7D3U0 N-acyl homoserine lactonase AttM *Agrobacterium fabrum*, Q988B9 mlr6805 4-pyridoxolactonase *Mesorhizobium japonicum*.

Белки WP_003254735.1 (27,8 кДа, ген имеет хромосомную локализацию), WP_062378634.1 (34,7 кДа, ген имеет плазмидную локализацию) и WP_180688401.1 (39,8 кДа, ген имеет хромосомную локализацию) штамма *P. putida* BS3701 образуют одну кладу с белками (бутстреп-поддержка 84%): O34409 Probable metallo-hydrolase YfiN *Bacillus subtilis*, O07607 Probable metallo-hydrolase YhfI *Bacillus subtilis*, C0SP91 Putative metallo-hydrolase YycJ *Bacillus subtilis*.

Таким образом, ни одна из анализируемых последовательностей белков штамма *P. putida* BS3701 (Таблица 2), принадлежащих семейству МБЛ-подобных металлогидролаз, не входит в кладу, содержащую последовательности МБЛ. Гены, кодирующие исследуемые белки штамма *P. putida* BS3701, функциональны: в экспоненциальной фазе роста обнаружены соответствующие специфические мРНК (данные не показаны). Были определены МПК и МБК: добавление меропенема в концентрации 8 мкг/мл или цефепима в концентрации 2 мкг/мл ингибировало рост культуры (Таблица 3). Таким образом, было показано, что штамм проявляет низкую резистентность к указанным антибиотикам, при этом гены-кандидаты функционируют.

Значения МБК и МПК, которые отражают суммарное действие нескольких механизмов, не позволяют выявить специфическую активность МБЛ. Дополнительно мы провели измерение чувствительности к меропенему в присутствии ЭДТА – специфического ингибитора активности МБЛ – с использованием диско-диффузионного теста. Отсутствие расширения зоны подавления роста между диском с ЭДТА и диском с меропенемом свидетельствовало об отсутствии МБЛ у штамма.

Обсуждение

Одной из острых проблем современности является растущая множественная устойчивость бактерий к антибиотикам. Эта тема активно исследуется, но как было

отмечено в исследовании Murray С. и соавт. такие исследования нацелены преимущественно на клинические штаммы микроорганизмов, в то время как гены резистентности широко распространены во всех экологических нишах [14]. Это особенно актуально для рода *Pseudomonas*, один из представителей которого, *Pseudomonas aeruginosa*, является опасным полирезистентным микроорганизмом. Представители рода *Pseudomonas* широко распространены во всех экологических нишах и включают в себя как патогенные виды вроде *P. aeruginosa*, так и безвредные почвенные виды, такие как *P. putida* [15]. Однако некоторые исходно почвенные микроорганизмы могут выступать в качестве устойчивых к антибиотикам патогенов. Так, были описаны случаи возникновения инфекционных заболеваний, вызванных *P. putida* [16, 17].

К настоящему времени существует большой массив информации о последовательностях бактериальных геномов и о подтвержденных экспериментально функциональных активностях белков. Это позволяет в некоторых случаях провести биоинформатический анализ исследуемых генов и, дополнив его относительно простыми экспериментами, сделать достоверные выводы о биологических функциях продуктов этих генов. В этом исследовании мы оценили 7 генов, продукты которых аннотированы как «MBL-fold metallohydrolase superfamily» и могли бы выступать в качестве потенциальных генов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам. Были использованы как генетические (биоинформатический анализ и оценка уровня экспрессии генов с использованием ПЦР в реальном времени), так и фенотипические (оценка МПК, МБК) подходы. Биоинформатический анализ выявил, что ни одна из анализируемых последовательностей белков штамма *P. putida* BS3701 (Таблица 2) не входила в кладу, содержащую последовательности МБЛ. Исследование фенотипа выявило низкий уровень резистентности у *P. putida* BS3701 к таким антибиотикам, как цефепим и меропенем. Имеющийся уровень резистентности может быть обусловлен наличием эффлюкс-систем, некоторые из которых были описаны у представителей *P. putida* [18, 19].

Заключение

Было показано, что продукты генов, аннотированных в геноме *P. putida* BS3701 как «MBL-fold metallohydrolase superfamily», не относятся к МБЛ. Эти белки не обеспечивают резистентность *P. putida* BS3701 к антибиотикам класса карбапенемов. Это означает, что данный штамм не представляет опасности в качестве источника генов устойчивости к соответствующим антибиотикам и может быть использован в прикладных задачах.

Работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF---193021X0001).

Литература

1. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 2013;19:549-559. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7
2. Bahr G., Gonzalez L.J., Vila A.J. Metallo- β -lactamases in the age of multidrug resistance: from structure and mechanism to evolution, dissemination, and inhibitor design. *Chem Rev.* 2021;121:7957-8094. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00138
3. López C., Delmonti J., Bonomo R.A., Vila A.J. Deciphering the evolution of metallo- β -lactamases: a journey from the test tube to the bacterial periplasm. *J Biol Chem.* 2022;298:101665. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101665
4. Baier F., Tokuriki N. Connectivity between catalytic landscapes of the metallo- β -lactamase superfamily. *J Mol Biol.* 2014;426:2442-2456. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.04.013
5. Alderson R.G., Barker D., Mitchell J.B. One origin for metallo- β -lactamase activity, or two? An investigation assessing a diverse set of reconstructed ancestral sequences based on a sample of phylogenetic trees. *J Mol Evol.* 2014;79:117-129. DOI: 10.1007/s00239-014-9639-7
6. Nikel P.I., de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. *Metab Eng.* 2018;50:142-155. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.005
7. Treviño M., Moldes L., Hernández M., Martínez-Lamas L., García-Riestra C., Regueiro B.J. Nosocomial infection by VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida*. *J Med Microbiol.* 2010;59:853-855. DOI: 10.1099/jmm.0.018036-0
8. Loucif L., Cherak Z., Chamlal N., Bendjama E., Gacemi-Kirane D., Grainat N., et al. First detection of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* in *Blattella germanica* cockroaches in an Algerian hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e00357-17. DOI: 10.1128/AAC.00357-17
9. Fernández M., Porcel M., de la Torre J., Molina-Henares M.A., Daddaoua A., Llamas M.A., et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Frontiers Microbiol.* 2015;6:871. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00871
10. Molina L., Udaondo Z., Duque E., Fernández M., Molina-Santiago C., Roca A., et al. Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *PloS One.* 2014;9:e81604. DOI: 10.1371/journal.pone.0081604
11. Filonov A.E., Kosheleva I.A., Samoilenko V.A., Shkidchenko A.N., Nechaeva I.A., Puntus I.F., et al. Biopreparation for cleaning soils from pollution by petroleum and petroleum products, method of its production and application. Patent RU2378060C2. 2010. Russian. (Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф. и соавт. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения. Патент RU2378060C2. 2010.)
12. Filonov A., Delegan Y., Puntus I., Valentovich L., Akhremchuk A., Evdokimova O., et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas putida* BS3701, a promising polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading strain for bioremediation technologies. *Microbiol Resour Anounc.* 2020;9(40):e00892-20. DOI: 10.1128/MRA.00892-20
13. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301
14. Murray C.J., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399:629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
15. Tang H., Yu H., Li Q., Wang X., Gai Z., Yin G., et al. Genome sequence of *Pseudomonas putida* strain B6-2, a superdegrader of polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxin-like compounds. *J Bacteriol.* 2011;193(23):6789-6790. DOI: 10.1128/JB.06201-11
16. Yoshino Y., Kitazawa T., Kamimura M., Tatsuno K., Yotsuyanagi H., Ota Y. *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother.* 2011;17:278-282. DOI: 10.1007/s10156-010-0114-0
17. Carpenter R.J., Hartzell J.D., Forsberg J.A., Babel B.S., Ganesan A. *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *J Infect.* 2008;56:234-240. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.01.004
18. Ramos J.L., Duque E., Godoy P., Segura A. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol.* 1998;180:3323-3329. DOI: 10.1128/JB.180.13.3323-3329.1998
19. Rojas A., Duque E., Mosqueda G., Golden G., Hurtado A., Ramos J.L., et al. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol.* 2001;183:3967-3973. DOI: 10.1128/JB.183.13.3967-3973.2001