

УДК 577.22

РАЗВИТИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTIPLANTIBACILLUS* *PLANTARUM* 8Р-АЗ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЯМИ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ХАРАКТЕРА ИХ ВЛИЯНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ

© 2024 г. О. А. Чернова¹, А. Р. Каюмов², *, М. И. Маркелова^{1, 2}, В. В. Сальников¹,
М. П. Кутырева², А. А. Ханнанов², М. С. Федорова², Д. Э. Журавлева², Н. Б. Баранова^{1, 2},
Д. А. Файзуллин, Ю. Ф. Зуев¹, В. М. Чернов¹

Представлено академиком А.Н. Гречкиным

Поступило 15.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Впервые показано, что развитие резистентности к антибиотикам (амоксициллину и кларитромицину) *in vitro* у пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 8р-аз, ассоциированное с крупномасштабными геномными перестройками, изменением профиля фенотипической чувствительности к антимикробным препаратам разных групп и эволюцией вирулентности, сопровождается также существенными изменениями внеклеточных мембранных везикул лактобациллы, транспортирующих липиды, полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Изменения связаны со структурой и составом везикул, а также их активностью в отношении биопленок условно-патогенных бактерий. Полученные данные актуальны для понимания молекулярных механизмов выживания микроорганизмов в условиях селективного давления антимикробных препаратов, функционального потенциала везикул пробиотиков и оценки их безопасности.

Ключевые слова: пробиотические бактерии, антибиотикорезистентность, внеклеточные везикулы, структура и функции, протеом, бактериальные биопленки

DOI: 10.31857/S2686738924060059

ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение везикулярного трафика у представителей всех доменов жизни открыло не только новые направления фундаментальных исследований механизмов межклеточной коммуникации и адаптации живых систем, но перспективы практического применения внеклеточных везикул бактерий в качестве новых типов вакцин, иммуномодуляторов, антимикробных препаратов и способов их доставки [1–3]. Особые надежды связывают

с везикулами бактерий-комменсалов, имеющих статус GRAS, широко используемых в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии в качестве пробиотиков [4–6]. Возможности крупномасштабных геномных перестроек и эволюции вирулентности, а также изменения везикулярного *cargo* у бактерий в условиях селективного давления [7–11] определяют актуальность анализа структурно-функциональных характеристик везикул, продуцируемых пробиотическими бактериями в разных условиях среды. Получение таких данных необходимо как для понимания молекулярных механизмов выживания комменсалов в стрессовых условиях, так и оценки безопасности пробиотиков и ихnanoструктур, нацеленных на практические приложения. Пул сообщений относительно выявления полезных свойств у везикул пробиотических бактерий расширяется [4–6], но публикаций относительно особенностей структуры и функций везикул, продуцируемых

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: kairatr@yandex.ru

соответствующими микроорганизмами в разных условиях среды, в том числе бактериями, адаптированными к антибиотикам, пока отсутствуют.

Ранее нами было показано, что развитие резистентности у пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3 (Биомед, Россия) к антибиотикам (амоксициллину и кларитромицину) *in vitro* сопровождается крупномасштабными геномными перестройками, изменением профиля фенотипической чувствительности к antimикробным препаратам разных групп, а также эволюцией вирулентности – у антибиотикорезистентного штамма *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx регистрируется высокий уровень токсигенности, в том числе генотоксичности *in vivo* в отношении модельного организма *Drosophila melanogaster* [11].

Выяснение особенностей структуры внеклеточных везикул *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx, а также влияния везикул штаммов на модельные бактериальные биопленки явилось задачей данного исследования, в результате выполнения которого впервые показано, что развитие антибиотикорезистентности у пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 сопровождается существенными изменениями структуры внеклеточных везикул, в том числе их протеомного профиля, а также характера влияния на биопленки условно-патогенных бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения внеклеточных везикул (ВВ) из культур *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx [1] использовали алгоритм, описанный в работе Kim с соавторами [2]. Для очистки ВВ от клеточно-дебриса проводили ультрацентрифугирование

в градиенте плотности Optiprep (45%, 35%, 20%, верхний слой – суспензия везикул); выделенные везикулы обрабатывали ДНКазой и РНКазой и суспендировали в 0.1 М водном растворе NaCl.

Трансмиссионную электронную микроскопию (TEM) изолированных ВВ проводили, как описано [12]. Препараты фиксировали с помощью раствора полилизина и контрастировали в растворе уранилацетата. Образцы анализировали на электронном микроскопе Hitachi HT 7800. Распределение размеров и концентрацию внеклеточных везикул в образцах изолированных везикул определяли с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA), используя анализатор NanoSight LM-10 (Malvern Instruments) [13].

ИК-спектры везикул получали с помощью прибора Invenio (Bruker), оснащенным детектором MCT, и используя приставку НПВО BioATR II с кристаллом ZnSe с наружным покрытием из Si. Спектры получали при спектральном разрешении 4.0 см^{-1} и числе накоплений 128. Соотнесение полос выполняли согласно [14].

Для идентификации белков везикул использовали хромато-масс-спектрометрию, как описано [15]. Трипсинолизированные белки анализировали на ВЭЖХ-МС системе с нанопотоковой системой ВЭЖХ Ultimate 3000 (Thermo, США). Использовали предколонку C18 PepMap100 (Thermo, США) и колонку Peaky-75-30 (капиллярная обращено-фазовая колонка Peaky, Молекта, Россия). Для каждого спектра проводили идентификацию с помощью поисковой машины MSFagger в составе программного пакета FragPipe 19.1. Поиск проводили против аминокислотных последовательностей белков штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx.

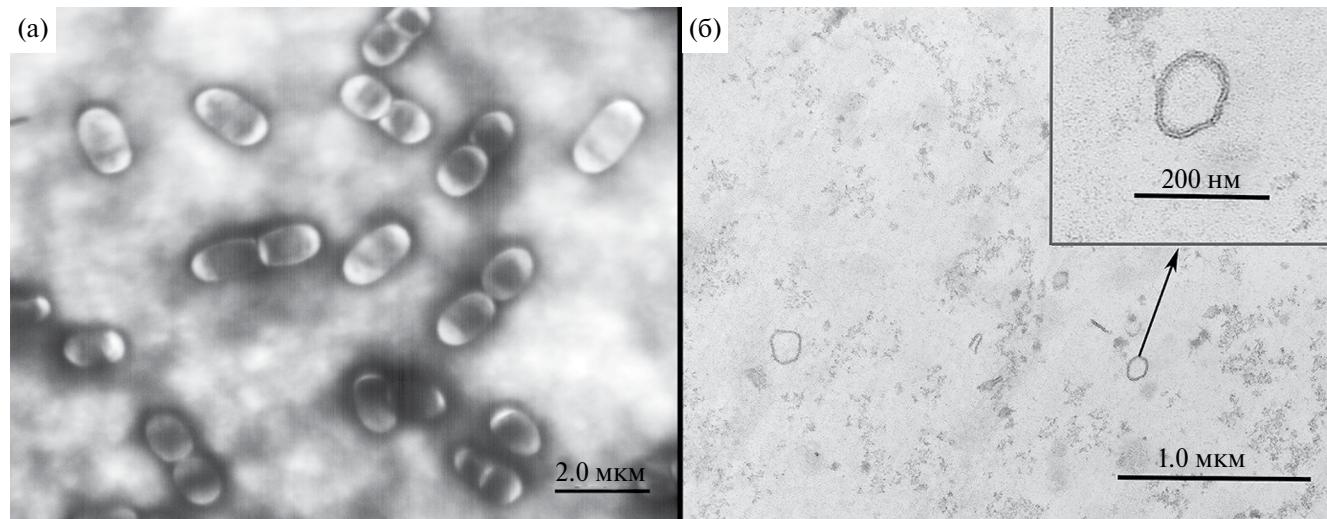


Рис. 1. Микрофотографии изолированных клеток (А) и везикул (Б) пробиотического штамма *L. plantarum* 8p-a3, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

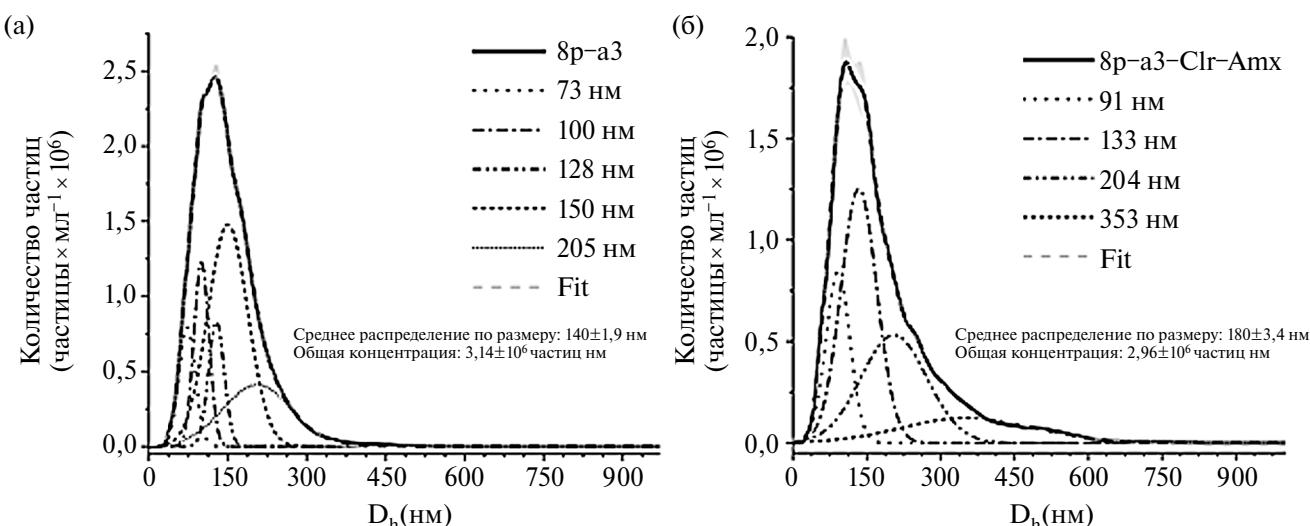


Рис. 2. Распределение размеров и концентрации изолированных везикул штаммов *L. plantarum* 8p-a3 (А) and *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (Б), данные получены с помощью анализа траекторий наночастиц.

Для валидации протеомных данных проводили анализ проб методом прицельной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра Sciex QTRAP 6500+ (Sciex, США) с ВЭЖХ системой ExionLC (Sciex, США). Для разделения пептидов использовали хроматографическую колонку HPLC Column Ultra Aqueous C18 Зим 150x3.0mm (Restek) с защитной предколонкой HPLC Guard Cartridge Ultra Aqueous C18 (Restek). Для каждого спектра проводили идентификацию с помощью поисковой машины MSFagger в составе программного пакета FragPipe 19.1.

Для формирования микробных биопленок и оценки влияния везикул на биомассу биопленок использовали алгоритм, описанный ранее [16]. В лунки планшетов с культурами типовых штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (получены из Американской коллекции культур клеток) и клинического изолята *Serratia marcescens* (любезно предоставлен Институтом медицинской микробиологии университета г. Гиссена, Германия) вносили внеклеточные везикулы штаммов *L. plantarum* (до конечной концентрации 1.25, 5 и 20 мкг/мл по общему белку везикул). Для окрашивания биопленок использовали кристаллический фиолетовый, как описано [16]. Оптическую плотность биопленок определяли при длине волны 600 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария).

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (программное обеспечение GraphPad Prism версия 6.0. для Windows). Эксперименты проводились в трех биологических и четырех технических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведения экспериментов были получены данные, свидетельствующие, что развитие антибиотикорезистентности у пробиотического штамма *L. plantarum* 8p-a3 сопровождается изменением физико-химических характеристик везикул. Согласно ТМ, везикулы штаммов 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx имеют типичную для бактериальных везикул морфологию – это сферические наноструктуры, окруженные мембраной (рис. 1).

Согласно NTA (рис. 2), пулы везикул, продуцируемых 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx, гетерогенны: у штаммов

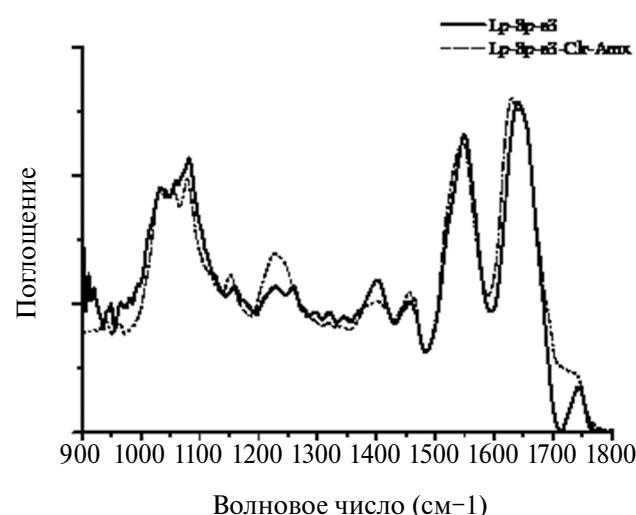


Рис. 3. Инфракрасные спектры везикулярных суспензий *L. plantarum* 8p-a3 (сплошная линия) и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (штриховая линия).

регистрируется несколько везикулярных субпопуляций, различающихся по средним значениям диаметра везикул и представленности; среднее значение диаметра везикул у штаммов 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx составляет 148 ± 1.9 нм и 180 ± 3.4 нм соответственно. Полученные данные относительно размеров везикул, а также гетерогенности везикулярного пула у штаммов *L. plantarum* не противоречат имеющимся

сведениям о структуре везикул, секрецируемых грамположительными (в том числе пробиотическими) бактериями, зависимости показателей от производителя и условий его роста [5–6], но наличие конкретных везикулярных субпопуляций у пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 и изменение их представленности при развитии у штамма антибиотикоустойчивости (рис. 2), впервые продемонстрировано в нашей

Таблица 1. Белки, идентифицированные в везикулах *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx, вовлеченные в процессы формирования и ремоделирования клеточной стенки, адгезии и агрегации

№	ID белка	Белок	COG	Длина (aa)	Таксон, в котором обнаруживается белок	Штаммы <i>L. plantarum</i>	
						8p-a3	8p-a3-Clr- Amx
1	WP_024002907.1	DNA/RNA non-specific endonuclease	F	314	<i>L. plantarum</i>		+
2	WP_003641230.1	LCP family protein	K	345	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
3	WP_003640920.1	LCP family protein	K	397	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
4	WP_003640483.1	transglycosylase domain-containing protein	M	767	<i>L. plantarum</i>	+	+
5	WP_046947840.1	LTA synthase family protein	M	701	<i>L. plantarum</i>		+
6	WP_046947851.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	M	444	<i>L. plantarum</i>	+	+
7	WP_072536237.1	NlpC/P60 family protein	M	370	<i>Lactobacillaceae</i>	+	+
8	WP_219041423.1	NlpC/P60 family protein	M	495	<i>L. plantarum</i>	+	+
9	WP_016511814.1	LysM domain-containing protein	M	354	<i>L. plantarum</i>		+
10	WP_134348695.1	C40 family peptidase	M	474	<i>L. plantarum</i>		+
11	WP_003642303.1	transglycosylase	M	131	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
12	WP_015825278.1	M15 family metallopeptidase	M	257	<i>L. plantarum</i>		+
13	WP_003642696.1	LTA synthase family protein	M	717	<i>L. plantarum</i>		+
14	WP_013355153.1	LysM domain-containing protein	M	211	<i>L. plantarum</i>		+
15	WP_003641876.1	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	M	267	<i>L. plantarum</i>	+	
16	WP_021356008.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	M	412	<i>L. plantarum</i>		+
17	WP_003640496.1	GH25 family lysozyme	M	445	<i>L. plantarum</i>		+
18	WP_046947871.1	GH25 family lysozyme	M	258	<i>L. plantarum</i>		+
19	WP_041153458.1	WxL domain-containing protein	None	1135	<i>L. plantarum</i>	+	+
20	WP_269106197.1	cell surface protein	None	476	<i>L. plantarum</i>	+	+
21	WP_003641660.1	trypsin-like peptidase domain-containing protein	O	420	<i>Lactiplantibacillus</i>		+
22	WP_003643378.1	matrixin family metalloprotease	O	375	<i>L. plantarum</i>		+
23	WP_024002613.1	matrixin family metalloprotease	O	208	<i>L. plantarum</i>		+
24	WP_011101077.1	DNA/RNA non-specific endonuclease	S	387	<i>L. plantarum</i>	+	+
25	WP_003643001.1	WxL domain-containing protein	S	269	<i>L. plantarum</i>	+	+
26	WP_003640312.1	endolytic transglycosylase MltG	S	401	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
27	WP_003641620.1	WxL domain-containing protein	S	245	<i>Lactiplantibacillus</i>	+	+
28	WP_003643037.1	WxL domain-containing protein	S	190	<i>L. plantarum</i>	+	+
29	WP_011101992.1	WxL domain-containing protein	S	260	<i>L. plantarum</i>	+	+
30	WP_003642319.1	WxL domain-containing protein	S	234	<i>Lactiplantibacillus</i>		+

Обозначения функциональных категорий COG: [F] Транспорт и метаболизм нуклеотидов; [K] Транскрипция; [M] Биогенез клеточной стенки/мембранны/оболочки; [O] Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны; [S] Функция неизвестна.

работе. Выявленные изменения в популяции везикул лактобациллы могут отражать изменения профиля везикулярного *cargo* (рис. 3, табл.).

Согласно данным инфракрасной спектроскопии, в везикулах обоих штаммов присутствуют липиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды и белки (рис. 3). Присутствие таких соединений в составе везикулярного *cargo* было установлено также в случае ряда других бактерий, в том числе пробиотических штаммов *L. plantarum*, и показано, что профиль соединений каждого конкретного класса может существенно изменяться у продуцента в разных условиях роста [3, 6]. В результате нашего исследования впервые установлено изменение везикулярного *cargo L. plantarum* при развитии антибиотикоустойчивости у пробиотической бактерии (рис. 3, табл.1).

Согласно данным протеомного анализа, везикулярные пулы белков у штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx имеют качественные и количественные различия [<https://repository.jpostdb.org/entry/JPST002373>]. В везикулах штамма 8p-a3 стабильно регистрируются 39 белков; наиболее представлены белки, участвующие в трансляции, структуре и биогенезе рибосом, биогенезе клеточной стенки и мембранны. В везикулах штамма 8p-a3-Clr-Amx стабильно регистрируются 216 белков; наиболее представленными являются белки, участвующие в транспорте и метаболизме аминокислот, транспорте

и метаболизме углеводов, трансляции, структуре и биогенезе рибосом, а также биогенезе клеточной стенки и мембранны.

Значительную часть везикулярного протеома в случае обоих штаммов составляют белки, вовлеченные в процессы адгезии и агрегации, формирования и ремоделирования клеточной стенки, в том числе гидролитические ферменты (нуклеазы, протеазы, пептидазы, гликозидгидролазы), критичные для взаимодействия с клетками эукариот и прокариот, способные оказывать влияние на бактериальные биопленки [5–6]. Поскольку качественный и количественный состав соответствующих белков в везикулах штаммов существенно различается (табл. 1), функциональный потенциал везикул штаммов, их эффекты в отношении мишней, тоже могут различаться.

В результате наших исследований был обнаружен дифференциальный характер влияния везикул штаммов *L. plantarum* на модельные биопленки условно-патогенных бактерий. Везикулы *L. plantarum* 8p-a3 и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx проявляли про- и антибиопленочную активность в отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa* (рис. 4) соответственно.

Так, везикулы пробиотического штамма индуцировали увеличение биомассы биопленок, а везикулы антибиотикорезистентного штамма, напротив, ее снижение. При этом в случае

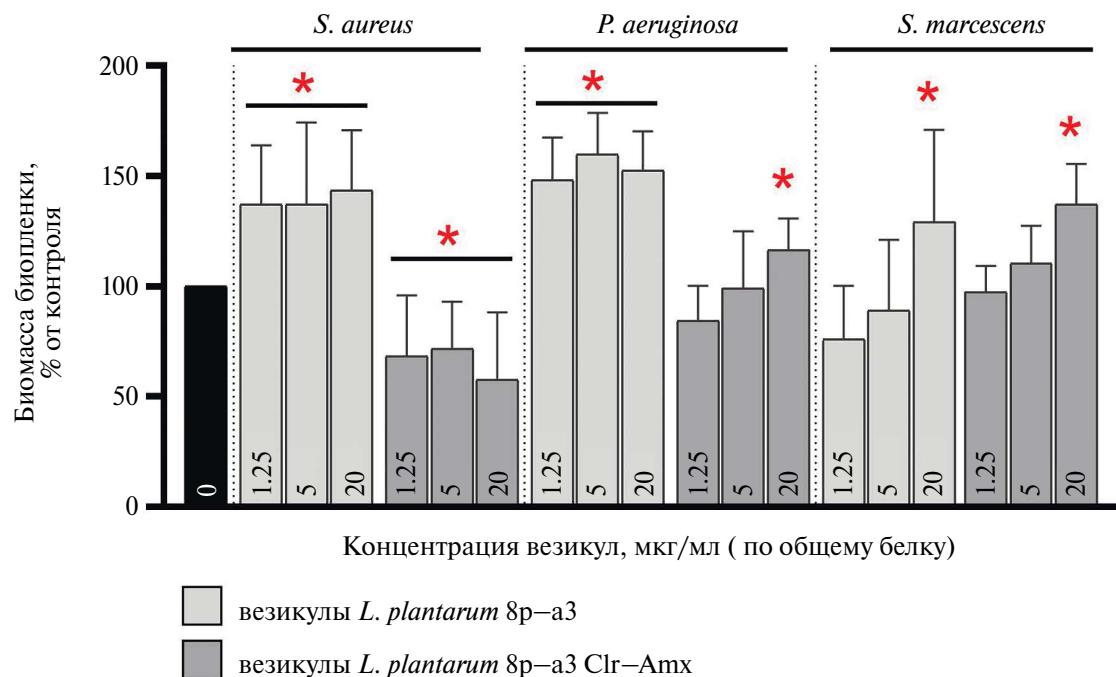


Рис. 4. Биомасса биопленок *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*, образованных в отсутствие (принято за 100%, черный столбец) и присутствии внеклеточных везикул *L. plantarum* 8p-a3 (светло-серые) и *L. plantarum* 8p-a3-Clr-Amx (темно-серые). На графиках представлены средние значения и указаны стандартные отклонения, * p < 0.05.

S. marcescens везикулы обоих штаммов стимулировали биопленкообразование. Способность везикул пробиотических бактерий негативно влиять на бактериальные биопленки описана – с везикулами пробиотиков связывают перспективы получения эффективных антибиопленочных агентов для подавления опасных типов инфекций у человека, ассоциированных с патогенными и условно-патогенными бактериями группы ESKAPE [6]. В этой связи наличие у везикул пробиотика *L. plantarum* 8p-a3 не антибиопленочной, а пробиопленочной активности в отношении модельных биопленок условно-патогенных бактерий указывает на то, что свойства пробиотических бактерий и ихnanoструктур не исчерпываются описанными ранее – спектр их биологических эффектов многое сложнее и для понимания потенциала функций везикул, нацеленных на практические приложения, требуется глобальная инвентаризация везикулярного *cargo*.

Нами была проведена инвентаризация везикулярного *cargo* у штаммов *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx в отношении состава белков (рис. 3), в результате которой было установлено, что в везикулах обоих штаммов присутствуют белки, которые могут как позитивно, так и негативно влиять на плотность биопленки (рис. 3), но у резистентного штамма регистрируется большее разнообразие гидролитических ферментов (пептидазы, лизоцим и др.), потенциально способных приводить к снижению биомассы бактериальных биопленок. Однако необходимо отметить, что часть везикулярного протеома штаммов *L. plantarum* – белки с неизвестной функцией, что препятствует определению полного списка кандидатов в про- или антибиопленочные агенты из пула соответствующих соединений. Помимо белков в эффекты бактериальных везикул в отношении бактериальных биопленок могут быть вовлечены и другие компоненты везикул – значимые различия в ИК-спектрах везикул *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx регистрируются в областях полисахаридов и липидов (рис. 3). Особенности профилей экзогенных липидов и полисахаридов, том числе пробиотических бактерий, могут обуславливать эффекты стимуляции или подавления бактериальных биопленок – это показано в отношении биопленок *Klebsiella pneumoniae* [17], а также *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* и *Escherichia coli* [18]. Так ли это в случае везикул *L. plantarum* 8p-a3 и 8p-a3-Clr-Amx, и связано ли это с обнаруженной нами у антибиотикоустойчивого штамма мутацией (*loss-of-function*) гена MprF [11] – мембранный белок, обеспечивающий (посредством синтеза лизофосфатидилглицерина и модификации липотехнологических кислот) физико-химические свойства клеточной поверхности, необходимые для выживания и экспансии бактерий в условиях селективного

давления антимикробных препаратов [19, 20], предстоит выяснить.

Таким образом, в результате наших исследований впервые показано, что адаптация пробиотического штамма *L. plantarum* к антимикробным препаратам, ассоциированная с крупномасштабными геномными перестройками, изменениями фенотипического резистома и эволюцией вирулентности, сопровождается также существенными изменениями свойств внеклеточных везикул лактобациллы, связанных с их структурой, составом и активностью в отношении биопленок условно-патогенных бактерий. Полученные данные открывают новые неожиданные свойства внеклеточных везикул пробиотиков и определяют необходимость всесторонней характеристики nanoструктур пробиотических бактерий, актуальной для оценки безопасности бактерий, широко используемых в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику ИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора И.О. Бутенко за помощь в протеомном анализе и А.А. Мзыкантову за помощь в пробоподготовке.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” и средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2023-0013.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gill S., Catchpole R., Forterre P. // FEMS Microbiol. Rev. 2019. V. 43,3. P. 273–303.
2. Kim W., Lee E. J., Bae I. H., et al. // J. Extracell. Vesicles. 2020. V. 9,1. P. 1793514.

3. Charpentier L.A., Dolben E.F., Hendricks M.R., et al. // Membranes. 2023. V. 13,9. P. 752.
4. Dominguez Rubio A.P., D'Antoni C.L., Piuri O.E., et al. // Front. microbiol. 2022. V. 13. P. 864720.
5. Krzyzek P., Marinacci B., Vitale I., et al. // Pharmaceuticals. 2023. V. 15,2. P. 522.
6. da Silva Barreira D., Laurent J., Lourenco J., et al. // Sci. Rep. 2023. V. 13,1. P. 1163.
7. Mancino W., Lugli G. A., van Sinderen D., et al. // Microorganisms. 2019. V. 7,12. P. 638.
8. Tardy L., Giraudeau M., Hill G. E., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116,34. P. 16927–16932.
9. Card K.J., Thomas M.D., Graves Jr.J.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V.118,5. P. e2016886118.
10. Chernova O.A., Chernov V.M., Mouzykantov A.A., et al. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2021. V. 57,2. P. 106253.
11. Kostenko V.V., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // Microbiol. Spectr. 2022. V. 10,3. P. e0236021.
12. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., et al. // Sci. World J. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
13. Burmatova A., Khannanov A., Gerasimov A., et al. // Polymers. 2023. V. 15,15. P. 3248.
14. Zucchiatti P., Mitri E., Kenig S., et al. // Anal. Chem. 2016. V. 88,24. P. 12090–12098.
15. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // J. Proteom. 2014. V. 110. P. 117–128.
16. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Holyavka, M.G., et al. // Sci. Rep. 2017. V.7. P. 46068
17. Hobby C.R., Herndon J.L., Morrow C.A., et al. // Microbiologyopen. 2019. V. 8,2. P. e00635.
18. Bai Y., Luo B., Zhang Y., et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V.185. P.1036–1049.
19. Slavetinsky C., Hauser J., Cordula Gekeler C., et al. // eLife . 2022. 11:e66376.
20. Arias-Rojas A, Arifah A, Angelidou G., et al. // PLoS Pathog. 2024. V.20,8. P. e1012462.

THE DEVELOPMENT OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE PROBIOTIC STRAIN *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* *8P-A3* IS ASSOCIATED WITH CHANGES IN THE STRUCTURE OF EXTRACELLULAR VESICLES AND THE CHARACTER OF THEIR EFFECT ON BACTERIAL BIOFILMS

**O. A. Chernova^a, A. R. Kayumov^b, *, M.I. Markelova^{a, b}, V. V. Salnikov^a, M. P. Kutyreva^b,
A. A. Khannanov^b, M. S. Fedorova^b, D. E. Zhuravleva^b, N. B. Baranova^{a, b}, D. A. Faizullin^a,
Yu. F. Zuev^a, V. M. Chernov^a**

*^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Centre of the Russian Academy of Science,
Kazan, Russian Federation*

^bKazan Federal University, Kazan, Russian Federation

**e-mail: kairatr@yandex.ru*

Presented by Academician of the RAS AN Grechkin

For the first time, it was shown that the development of resistance to antibiotics (amoxicillin and clarithromycin) *in vitro* in the probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* 8p-a3, associated with large-scale genomic rearrangements, a change in the profile of phenotypic sensitivity to antimicrobials of different groups, and the evolution of virulence, is also accompanied by significant changes in the lactobacillus-derived extracellular membrane vesicles transferring lipids, polysaccharides, proteins, and nucleic acids. The changes are related to the structure and *cargo* of vesicles, as well as their activity against biofilms of opportunistic bacteria. The data obtained are relevant for understanding the molecular mechanisms of survival of microorganisms under the selective pressure of antimicrobials, the functional potential of the probiotic vesicles and assessing their safety.

Keywords: probiotic bacteria, antibiotic resistance, extracellular vesicles, structure and function, proteome, bacterial biofilms