

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

На правах рукописи

МАКАШОВА МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *Yersinia pestis* С ПОЧВЕННОЙ МИКРОФАУНОЙ
ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА ЧУМЫ**

1.5.11 – микробиология

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Ерошенко Г. А.**

Саратов – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Генетическое разнообразие и географическое распространение штаммов <i>Y. pestis</i>	15
1.2 Современные представления об экологии и персистенции <i>Y. pestis</i> в природных очагах чумы.....	20
1.3 Взаимодействие возбудителя чумы с членами почвенных биоценозов.....	26
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Штаммы бактерий, использованные в работе, и условия их культивирования.....	37
2.2 Анализ биохимических свойств штаммов <i>Y. pestis</i>	39
2.3 Определение чувствительности к бактериофагам Л-413С и Покровской.....	39
2.4 Определение признака пигментсорбции.....	40
2.5 Определение питательных потребностей штаммов <i>Y. pestis</i>	40
2.6 Определение зависимости роста от ионов кальция при температуре 37 °С.....	41
2.7 Определение плазмидного состава.....	41
2.8 Получение компетентных клеток и трансформация штаммов <i>Y. pestis</i>	41
2.9 Определение вирулентности штаммов <i>Y. pestis in vivo</i>	42
2.10 Выделение почвенных амёб.....	43
2.11 Выделение почвенных нематод.....	44
2.12 Выделение ДНК бактерий, амёб и нематод.....	44
2.13 Полимеразная цепная реакция.....	45
2.14 Секвенирование ДНК.....	45
2.15 Определение систематической принадлежности амёб, нематод, бактерий.....	46
2.16 Филогенетический анализ амёб, почвенных и энтомопаразитических нематод.....	46
2.17 Филогенетический анализ возбудителя чумы.....	52
2.18 Статистический анализ.....	54
ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> АНТИЧНОГО БИОВАРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT, КОНСТРУИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ШТАММОВ	56
3.1 Фенотипические и генетические особенности штаммов <i>Y. pestis</i> из Горно-Алтайского высокогорного очага в сравнении со штаммами античного биовара из других природных очагов чумы.....	57
3.2 Получение рекомбинантных флуоресцентных штаммов <i>Y. pestis</i> филогенетической линии 4.ANT с использованием плазмид pTurboGFP-B и pKatushka-2S.....	85

ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT С ПРОСТЕЙШИМИ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА.....	91
4.1 Систематическая принадлежность простейших из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага.....	91
4.2 Моделирование долговременного сохранения в акантамебах <i>Y. pestis</i> с использованием флуоресцентного штамма 4.ANT с плазмидой pTurboGFP-B и анализ динамики взаимодействия штамма возбудителя чумы и акантамеб.....	102
4.3 Влияние длительного сосуществования <i>Y. pestis</i> и акантамеб на сохранение фенотипических, генетических и вирулентных свойств клеток <i>Y. pestis</i>	111
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ <i>Y. pestis</i> С НЕМАТОДАМИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ НЕМАТОД ИЗ ГОРНОГО АЛТАЯ И ТУВЫ.....	116
5.1 Анализ взаимодействия <i>Y. pestis</i> филогенетической линии 4.ANT с почвенными нематодами из природного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.....	116
5.1.1 Определение систематической принадлежности почвенных нематод из нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.....	117
5.1.2 Изучение особенностей биопленкообразования и влияния <i>Y. pestis</i> филогенетической линии 4.ANT на нематод.....	122
5.2 Систематическая принадлежность паразитических нематод из природного биоценоза Тувинского горного очага чумы и анализ их микробиоты.....	126
5.2.1 Определение систематической принадлежности энтомопаразитических нематод блох из Тувинского горного очага чумы.....	127
5.2.2 Определение состава микробиоты энтомопаразитических нематод из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	145
ВЫВОДЫ.....	155
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ А Номера доступа депонированных в базе данных NCBI GenBank участков генов простейших, нематод и бактерий.....	189

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Одним из наиболее актуальных направлений современных исследований возбудителей опасных инфекционных болезней является изучение биологических механизмов их распространения и сохранения во внешней среде вне организма хозяина. Патогенные микроорганизмы характеризуются разнообразными механизмами персистенции, такими как независимое сапрофитное существование, симбиоз с различными биологическими видами почвенных и водных биоценозов, паразитическое сохранение в других живых системах. Наибольшую актуальность в этой области имеет изучение энзоотий природно-очаговых инфекционных болезней, обладающих высоким эпидемическим потенциалом. В первую очередь к ним относится возбудитель чумы *Yersinia pestis* – этиологический агент особо опасной инфекционной природно-очаговой болезни с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи инфекции.

В XXI веке чума остается одной из главных биологических угроз для здравоохранения, что обусловлено высокой вирулентностью возбудителя и наличием большого числа природных очагов чумы, расположенных практически во всех частях света на территории более чем 50 государств [Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств, 2022]. В мире сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по чуме. В 2023 г. случаи чумы произошли в пяти странах: Монголии (5 случаев), Китайской Народной Республике (3), Республике Мадагаскар (14), Демократической Республике Конго (60), Соединенных Штатах Америки (2). Всего зарегистрировано 84 подтвержденных случая заболевания, из них 26,2 % (22 случая) с летальным исходом [URL: <https://67.rospotrebnadzor.ru/content/143/124193> (дата обращения 15.02.24); Попов и др., 2024].

В 2023 г. в Российской Федерации эпизоотии чумы выявлены на территории двух, Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного, из одиннадцати природных очагов чумы. В соответствии с прогнозом эпизоотической активности очагов чумы в 2024 г. сохранится напряженная эпидемиологическая обстановка на территории Республики Алтай и Республики Тыва [Попов и др., 2024]. Очаги Горного Алтая и Тувы на протяжении последних десятилетий проявляют постоянную эпизоотическую активность. В 2014–2016 гг. на территории Республики Алтай произошло три случая заражения чумой человека,

впервые после 35 лет отсутствия чумы в Российской Федерации [Кутырев и др., 2014; Балахонов и др., 2016].

Возбудитель чумы *Y. pestis* является ветвью эволюции возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* и сочетает в себе черты повсеместно распространенного в почве сапрофитного предшественника и образовавшегося на его основе системного патогена, освоившего кровяное русло теплокровных животных. Возбудитель чумы имеет сложный жизненный цикл, который включает две известные стадии существования – в носителе и переносчике. В качестве переносчиков могут выступать клещи, вши и другие артроподы, но основными векторами переноса возбудителя чумы являются блохи, относящиеся к 280 видам, тогда как носителями инфекции является 368 вид млекопитающих, из которых 286 видов относятся к грызунам [Dubynskiy, Yeszhanov, 2016; Mahmoudi et al., 2021; Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств, 2022]. Особенности экологии *Y. pestis* остаются малоисследованными. Геном, полученный от сапрофитного предшественника (98 % идентичности последовательностей генов-гомологов у этих двух видов иерсиний), обеспечивает потенциал для длительного существования возбудителя чумы в природном биоценозе очагов чумы вне организмов носителей и переносчиков, в пользу чего накапливается все больше данных [Никульшин и др., 1992; Пушкарева, 2003; Бронева и др., 2005; Кошель и др., 2016; Оглодин и др., 2017; Chain et al., 2004; Laudisoit, 2009; Benavides-Montaña, Vadyvaloo, 2017; Markman et al., 2018]. Вид *Y. pestis* включает 7 подвигов и отличается сложной внутривидовой структурой, что обусловлено эволюцией отдельных филогеографических групп в различных ландшафтно-географических зонах (степи, полупустыни, пустыни, низкогорные и высокогорные ландшафты). Штаммы основного подвида высоко вирулентны и эпидемически значимы, широко распространены на разных континентах. Штаммы 6 неосновных подвигов вирулентны, в основном, для мелких грызунов, и могут вызывать лишь единичные случаи заболевания чумой человека [Ерошенко и др., 2022; Kutyrev et al., 2018].

Эпидемическая значимость очаговых территорий определяется вирулентностью возбудителя как главной составляющей паразитарной системы очагов. Исследование особенностей экологии возбудителей важно для выяснения закономерностей проявления активности природных очагов инфекций. Функционирование очагов чумы включает периоды активности и периоды покоя, причины смены которых до сих пор точно не установлены. В периоды проявления активности территории очагов охватываются эпизоотиями

среди грызунов, во время которых возбудитель передается по классическому механизму горизонтальной трансмиссии: от грызуна к грызуну через укусы артропод. В периоды покоя эпизоотии в очагах не регистрируются, отсутствуют находки зараженных грызунов и, соответственно, не выделяются культуры *Y. pestis*. Механизмы сохранения возбудителя чумы в межэпизоотический период и пусковые механизмы активизации эпизоотических процессов в природных очагах чумы остаются невыясненными. Ранее предполагалось, что в периоды между эпизоотиями *Y. pestis* сохраняется в «энзоотичных циклах», циркулируя между частично резистентными грызунами и их переносчиками на ограниченных участках очага [Акиев, 1989; Gage, Kosoy, 2005]. Однако доказательств циркуляции возбудителя чумы в «энзоотичных циклах» в периоды покоя очага до сих пор не получено, и не найдены участки очагов, в которых возбудитель сохраняется в эту фазу. Накапливается все больше данных, свидетельствующих о сохранении возбудителя чумы в ассоциации с почвенными простейшими [Никульшин и др., 1992, Пушкарева, 2003; Литвин В.Ю., 2003; Кошель и др., 2016; Benavides-Montaña, Vadyvaloo, 2017]. Разработана гипотеза вертикальной трансмиссии, в соответствии с которой энтомопаразитические нематоды в ассоциации с *Y. pestis* служат источниками «выноса» возбудителя из почвенного в наземный биоценоз с инициацией эпизоотического процесса в очаге [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011; Kutyrev et al., 2022].

Получение знаний о механизмах персистенции возбудителя чумы необходимо для понимания закономерностей функционирования природных очагов чумы, выяснения причин смены в них фаз активности и покоя, и проведения на основе полученных данных оптимизации объема и направлений профилактических мер по контролю за чумой в целях повышения эффективности проводимого эпидемиологического мониторинга и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Степень разработанности проблемы

Для ряда бактериальных инфекций экспериментально подтверждена возможность длительного сохранения возбудителя вне организмов носителей и переносчиков в ассоциации с членами почвенных и водных биоценозов – простейшими, нематодами, грибами, растениями и другими организмами [Литвин и др., 1997; Greub, Rauolt, 2004; König, Varma, 2006]. Большое внимание уделяется изучению взаимодействий патогенных микроорганизмов с простейшими, поскольку процесс фагоцитоза имеет общие черты у амёб и макрофагов млекопитающих [Harb et al., 2000; Ke et al., 2013]. Амёбы рассматриваются

в качестве «тренировочных площадок», на которых происходил отбор наиболее приспособленных клеток бактерий, способных избегать внутриклеточного переваривания, размножаться и выходить во внешнюю среду [Barker, Brown, 2004; Molmeret et al., 2005]. Способность к внутриклеточному выживанию в амебах показана для патогенных бактерий *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae*, *M. avium*, *M. marinum*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii* и разных вирусов [Essig et al., 1997; La Scola, Raoult, 2001; Abd et al., 2007; El-Etr et al., 2009; Ben Salah, Drancourt, 2010; Al-Quadan et al., 2012; Kennedy et al., 2012; Olofsson et al., 2013; Ravindra et al., 2019; Dey et al., 2020]. Поскольку размножение в макрофагах является обязательной стадией развития чумы в организмах млекопитающих, предполагается, что *Y. pestis* также может взаимодействовать с амебами и использовать их в своем жизненном цикле [Ke et al., 2013; Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017]. Результаты исследований, доказывающих сохранение возбудителя чумы в ассоциации с различными простейшими *Hartmannella rhysodes*, *Tetrahymena pyriformis*, *Dictyostelium discoideum*, *Acanthamoeba castellanii* сроком от 2 дней до 14 месяцев, послужили основой для выдвижения гипотезы о сохранении возбудителя чумы в почвенных биоценозах в ассоциациях с простейшими [Никульшин и др., 1992; Пушкарева, 2003; Литвин, 2003; Бренева и др., 2005; Попов и др., 2007; Кошель и др., 2016; Оглодин и др., 2017; Laudisoit, 2009; Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017; Markman et al., 2018].

Имеются отдельные сообщения по сохранению возбудителей в других массовых членах почвенных биоценозов – почвенных и паразитических нематодах, а также по распространению с их помощью бактерий в пределах биотопа [Видяева и др., 2010; Кошель, 2015; Abu Hatab et al., 1998; Gengler et al., 2015]. В связи со способностью *Y. pestis* образовывать биопленку на кутикуле нематод была выдвинута гипотеза об участии паразитических нематод в переносе возбудителя чумы из почвы в блох, получившая название гипотезы вертикальной трансмиссии [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011; Ерошенко и др., 2012; Darby et al., 2002; Joshua et al., 2003]. Высокая численность простейших в почвах природных очагов чумы, достигающая 300 тыс. клеток амеб на 1 г почвы и 10^7 нематод на 1 м², позволяет рассматривать эти массовые организмы природных почвенных биотопов в качестве потенциальных природных резервуаров возбудителя чумы [Кошель и др., 2015; Back et al, 2005].

Однако, исследования механизмов взаимодействия клеток *Y. pestis* и почвенных простейших и нематод находятся на начальных этапах. Необходимо проведение разно-стороннего анализа с применением современных технологий и мультидисциплинарных подходов для установления особенностей и закономерностей их взаимодействий; оценки оказываемого возбудителем чумы влияния на почвенную микрофауну, в том числе и на молекулярном уровне. Для решения вопроса о сохранении *Y. pestis* в природных очагах во время межэпизоотических периодов необходимым этапом является изучение долгосрочных взаимодействий организмов на молекулярном, организменном и популяционном уровнях. Особое значение для понимания механизмов энзоотии чумы имеет анализ взаимоотношений организмов, выделенных на территории одного биоценоза. Так проведены эксперименты по взаимодействию штаммов *Y. pestis* и членов почвенных биоценозов, выделенных в Северо-Западном Прикаспии и Горном Алтае [Кошель, 2016, Оглодин и др., 2017]. В то же время в литературе отсутствуют сведения по моделированию долгосрочного сохранения *Y. pestis* и изучению взаимодействий с простейшими и нематодами, выделенными на тех же участках очага, что и штаммы *Y. pestis*. Отсутствуют данные о видовом разнообразии амёб и нематод в очагах горного и высокогорного типов, в то время как именно эти энзоотичные по чуме территории Российской Федерации находятся в настоящее время в активном состоянии. Наиболее активными на протяжении последних десятилетий остаются территории Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы, в которых циркулируют высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида. Наиболее актуальным является изучение взаимодействий штаммов *Y. pestis* с представителями почвенной микрофауны, выделенными на эпизоотически активных территориях Горного Алтая.

Развитие современных технологий микробиологии и молекулярной генетики, появление высокотехнологичного оборудования позволяет получить новые сведения о взаимодействии возбудителя чумы с членами почвенных биоценозов с использованием современных мультидисциплинарных методических подходов (капиллярное и высокопроизводительное секвенирование; люминесцентная микроскопия; генно-инженерные технологии и моделирование в лаборатории условий природных биоценозов). Без выяснения особенностей взаимодействия возбудителя чумы с членами экосистемы природных оча-

гов чумы невозможно установление основ сложной экологии возбудителя чумы, механизмов сохранения возбудителя в периоды между эпизоотиями, закономерностей инициации и развития эпизоотического процесса. Эти знания необходимы для повышения эффективности проводимого эпидемиологического мониторинга в природных очагах чумы и для оптимизации комплекса профилактических мер по контролю за чумой на этих территориях.

Цель исследования: Комплексная характеристика свойств и взаимодействие штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Задачи исследования:

1. Определить фенотипические и генетические особенности штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горного Алтая и Тувы в сравнении со штаммами других филогенетических линий античного биовара из природных очагов мира.

2. Сконструировать флуоресцентные штаммы линии 4.ANT с использованием плазмид pTurboGFP-B и pKatushka-2S для моделирования процесса взаимодействия *Y. pestis* с членами почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

3. Провести анализ взаимодействия и длительности сохранения *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT в сокультуре с акантамебами из почв нор Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и охарактеризовать видовой состав простейших.

4. Изучить особенности взаимодействия *Y. pestis* с использованием флуоресцентного штамма филогенетической линии 4.ANT со свободноживущими нематодами из почв нор Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, установить систематическую принадлежность нематод.

5. Определить систематическую принадлежность энтомопаразитических нематод из Тувинского горного очага чумы. Провести анализ микробиоты паразитических нематод Тувинского горного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы.

Научная новизна. При исследовании фенотипических особенностей штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы выявлена зависимость их роста от аминокислот метионин, фенилаланин, треонин и вариабельность зависимости от аминокислоты цистеин, в отличие от штаммов других филогенетических линий античного биовара. Впервые определены питательные потребности штаммов филогенетических линий 1.ANT и 3.ANT2, получены

новые данные по ауксотрофии штаммов 0.ANT3, 0.ANT5, 2.ANT3, 4.ANT античного биовара. У штаммов филогенетической ветви 0.ANT5 впервые установлена зависимость роста от присутствия в среде лейцина, вызванная сдвигом рамки считывания в гене *leuA*, а для штаммов ветви 1.ANT впервые определена уникальная для штаммов античного биовара питательная потребность в пролине. Выявлены 19 мутаций в 14 генах метаболических путей серы и цистеина, при этом для каждой эволюционной линии античного биовара характерен свой мутационный профиль. Получен патент № RU 2769790 С1 «Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Y. pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах».

Показано и подтверждено при анализе нуклеотидных последовательностей генов рибосомальной РНК (рРНК) широкое распространение на различных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в почвах нор грызунов простейших *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. Впервые показано длительное в течение 22 месяцев сохранение *Y. pestis* линии 4.ANT в отсутствие питательных веществ при совместном культивировании с *A. castellanii*, выделенной на том же участке очага, а также установлена цикличность изменения концентрации возбудителя в этих условиях.

Показано отсутствие токсичности и влияния штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на продолжительность жизни почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы при их культивировании на газоне этого штамма в течение 24 ч с последующим переносом на газоны *Escherichia coli* и культивированием в течение 2 недель.

В блохах *Citellophyllus tesquorum* и *Frontopsylla elatoides* с территории Тувинского горного очага чумы обнаружены энтомопаразитические нематоды рода *Rubzovinema*, филогенетически близкие полигостальному виду *R. polyxenica* из Волго-Уральского степного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы. Впервые исследована микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы, в составе которой выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

Теоретическая значимость. Выявленные фенотипические и генетические особенности дополняют характеристику и молекулярный портрет штаммов *Y. pestis* различных

филогенетических линий античного биовара и могут быть использованы в качестве генетических меток для внутривидовой дифференциации возбудителя. Определение видового состава простейших и нематод из почв нор грызунов расширяет знания о членах почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Установление возможности длительного сохранения и размножения в амебах *A. castellanii* штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT, выделенных на тех же участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, и получение данных о взаимодействии штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT с почвенными нематодами составляют основу для выявления природных резервуаров чумы в почвенных биоценозах природных очагов. Установленная систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод и выявленная полигостальность нематод-паразитов блох указывает на их важную роль в регуляции численности блох – переносчиков чумы и, как следствие, в регуляции интенсивности эпизоотических процессов в очагах. Полученные сведения о составе микробиоты паразитарной системы «нематода–блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы расширяют представления об условиях персистенции и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы в процессе своего жизненного цикла, и дополняют имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов чумы.

Практическая значимость. Сконструированные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, содержащие плазмиды pTurboGFP-B и Katushka-2S, могут быть использованы для изучения взаимодействия *Y. pestis* с микро- и макроорганизмами. Методика получения флуоресцентных штаммов оформлена в виде методических рекомендаций учрежденческого уровня «Получение рекомбинантных биолюминесцентных штаммов *Yersinia pestis* и *Escherichia coli*» (одобрены Ученым советом ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора и утверждены директором института, протокол № 5 от 05.12.2019 г.). Полученные штаммы *Y. pestis* депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора под номерами KM2083 и KM2084.

В международной базе данных NCBI GenBank депонированы 29 нуклеотидных последовательностей, включающих участки генов рРНК почвенных амеб и нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага, энтомопаразитических нематод *Rubzovinema sp.*

и бактерии *Wolbachia sp.*, список изолятов с номерами доступа приведен в Приложении А. Данные по выявлению возможных природных резервуаров возбудителя чумы в почвенных биоценозах Горно-Алтайского высокогорного очага чумы могут быть использованы для оптимизации тактики эпизоотологических обследований на очаговых территориях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида, как и штаммы других линий эволюции этого биовара, зависят от присутствия в среде аминокислот фенилаланина, метионина и треонина, но отличаются от них вариабельностью зависимости от цистеина. Штаммы других филогенетических линий нуждаются дополнительно в лейцине и пролине. В 14 генах метаболических путей серы и цистеина античного биовара содержится 19 мутаций, для большинства эволюционных линий характерен свой мутационный профиль этих генов.

2. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенные в Горно-Алтайском высокогорном очаге, в условиях эксперимента способны сохраняться в ассоциации с амёбами *A. castellanii* в отсутствие питательных веществ в течение 22 месяцев без изменения свойств и потери вирулентности, формировать биопленку на кутикуле почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* и образовывать конгломераты клеток в их пищеварительном тракте, не оказывая значимого влияния на продолжительность жизни нематод.

3. В блохах *C. tesquorum* и *F. elatoides* из Тувинского горного очага чумы присутствуют энтомопаразитические нематоды рода *Rubzovinema*. Микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы включает представителей α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследование. Диссертационное исследование выполнялось на базе лаборатории молекулярной микробиологии отдела микробиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в рамках научно-исследовательских тем: №78-3-19 «Анализ закономерностей эволюции и персистенции *Yersinia pestis* в почвенных биоценозах и совершенствование молекулярного типирования возбудителя чумы» 2019–2021 гг. (№ гос.

регистрации АААА-А16-116112810061-0), и №98-3-22 «Пространственно-временные закономерности эволюции, циркуляции и персистенции *Yersinia pestis* в природных очагах чумы Восточной Европы и Центральной Азии» (№ гос. регистрации 121112200283-5).

Личный вклад автора состоит в проведении основного объема исследований, а именно анализа литературных источников, планировании экспериментов, получении, анализе и оформлении результатов исследования. Автором выполнены исследования по изучению филогении, биохимических особенностей, фенотипических и генетических особенностей штаммов *Y. pestis* античного биовара, изучению взаимодействий *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с членами почвенной микрофауны, определению систематического положения и филогенетическому анализу почвенных организмов, энтомопатогенных нематод и микробиоты паразитарной системы. Эксперименты по определению систематического положения организмов и длительному выживанию *Y. pestis* с акантамебами спланированы совместно с сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии к.б.н., в.н.с. Оглодиным Е.Г. Совместно с сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии к.б.н., с.н.с. Куклевой Л.М. и сотрудником сектора геной инженерии к.м.н., в.н.с. Тучковым И.В. получены флуоресцентные штаммы *Y. pestis*. Совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа (зав. лабораторией к.х.н. Краснов Я.М., к.х.н., с.н.с Гусева Н.П., к.б.н., Шарапова Н.А., н.с. Нарышкина Е.А., м.н.с. Федоров А.В., м.н.с. Катышев А.Д.) получены полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* и последовательности участков генов рРНК других организмов.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов работы подкреплена значительным объемом исследований в серии повторяющихся экспериментов с использованием современного сертифицированного оборудования и методов, соответствующих задачам и целям исследования.

Материалы исследования были представлены на ряде конференций и съездов различного уровня: X Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 16–20 апреля 2018 г.), XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 20–21 ноября 2018 г.), межучрежденческих онлайн-семинарах-конференциях «Перспективные направления научных исследований в области эпидемиологии, разработки и совершенствования методов диагностики опасных инфекций, анализа генома, протеома их возбудителей» (11 июня 2019 г.) и «Применение молекулярно-генетических

и иммунологических методов для совершенствования мониторинга природно-очаговых и особо опасных инфекций» (24 мая 2022 г.), XI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2–4 октября 2019 г.), на XIV–XV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 24–26 мая 2021 г., 28–30 марта 2022 г., 27–29 марта 2023 г.), на XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 5–6 октября 2021 г.), на Международном симпозиуме “Yersinia 14” (Санкт-Петербург, 26–28 сентября 2022 г.), на итоговых конференциях ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (2018, 2021–2022 гг.); на конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2023» (Москва, 27–28 апреля 2023 г.), на XXV Международной научной конференции «Current Issues on Zoonotic Diseases» (Улан-Батор, 23 июня 2023 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 1 патент на изобретение, 4 статьи в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России», из которых 3 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в МБД Scopus.

Структура диссертации. Диссертация представлена на 189 страницах текста, состоит из введения, главы обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 28 рисунками. Библиографический список содержит 288 отечественных и зарубежных источников.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Генетическое разнообразие и географическое распространение штаммов *Y. pestis*

Чума представляет собой зоонозную особо опасную инфекционную болезнь бактериальной природы, возбудитель которой циркулирует в природных очагах мира, передаваясь от одного теплокровного носителя другому с помощью переносчиков – артропод [Черкасский, 1994]. Этиологическим агентом чумы является грамотрицательная бактерия *Y. pestis*, представляющая собой овоидную палочку длиной 1,5–2 мкм. Геном возбудителя чумы представлен кольцевой хромосомой, размер которой варьирует в зависимости от внутривидовой принадлежности и в среднем составляет 4,65 м.п.н., и тремя плазмидами – родоспецифичной плазмидой кальцийзависимости (pCad, pCD1, pYV – 70,3 т.п.н.) и видоспецифичными плазмидами капсулообразования (pFra, pMT1 – 92,2 т.п.н.) и пестициногенности (pPst, pPCP1 – 9,6 т.п.н.).

В род *Yersinia*, помимо возбудителя чумы *Y. pestis*, входят и другие патогенные для человека прототрофные бактерии, возбудители кишечных инфекций с фекально-оральным механизмом передачи инфекции – *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Возбудитель чумы является клональным вариантом *Y. pseudotuberculosis*, дивергировавшим от своего прототрофного предка предположительно 5700–6000 лет назад [Chain et al., 2004; Rasmussen et al., 2015; Valtueña et al., 2017; Spyrou et al., 2018; Rascovan et al., 2019]. В процессе эволюции *Y. pestis* помимо присутствовавшей в составе генома предшественника плазмиды pCad в результате горизонтального переноса генов приобрела еще две плазмиды pFra и pPst, кодирующие факторы патогенности, необходимые для перехода к трансмиссивному механизму передачи и реализации инфекции внутри макроорганизма [Попов и др., 1980; Проценко и др., 1983; Кутырев и др., 1986; Perry, Fetherston, 1997; Hinnebusch et al., 2002; Perry, 2003; Wolf-Watz, 2010; Gao et al., 2020]. Помимо приобретения нового генетического материала в количестве 32 генов, в основе этой эволюционной адаптации возбудителя к новой среде обитания лежал также масштабный процесс разрушения генов в результате накопления единичных нуклеотидных замен, indel-мутаций, распространения мобильных IS-элементов (IS100, IS285, IS1661, IS1541), приведший к

потере функций более чем 460 генов [Parkhill et al., 2001; Deng et al., 2002; Chain et al., 2004; Wu et al., 2022].

В процессе распределения по разным географическим районам и последующей независимой эволюции происходило формирование отдельных популяций штаммов *Y. pestis* и накопление различий между ними. На основе этих отличий создавали различные классификации вида с разделением штаммов возбудителя чумы на подвиды и биовары. В результате анализа полногеномных последовательностей различных филогенетических популяций *Y. pestis* на смену систематизации штаммов по фенотическим признакам пришли генетически обоснованные классификации (Рисунок 1.1) [Morelli et al., 2010; Cui et al., 2013]. В процессе эволюции от возбудителя псевдотуберкулеза от древнего ствола 0 дивергировали древние ветви неосновных подвидов 0.PE2, 0.PE3, 0.PE4 и 0.PE7 и античного биовара 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3. Затем в точке политомии центрального узла (N07, Рисунок 1.1) произошло одновременное отделение филогенетических линий 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT и 4.ANT от общего ствола эволюции 0.ANT.

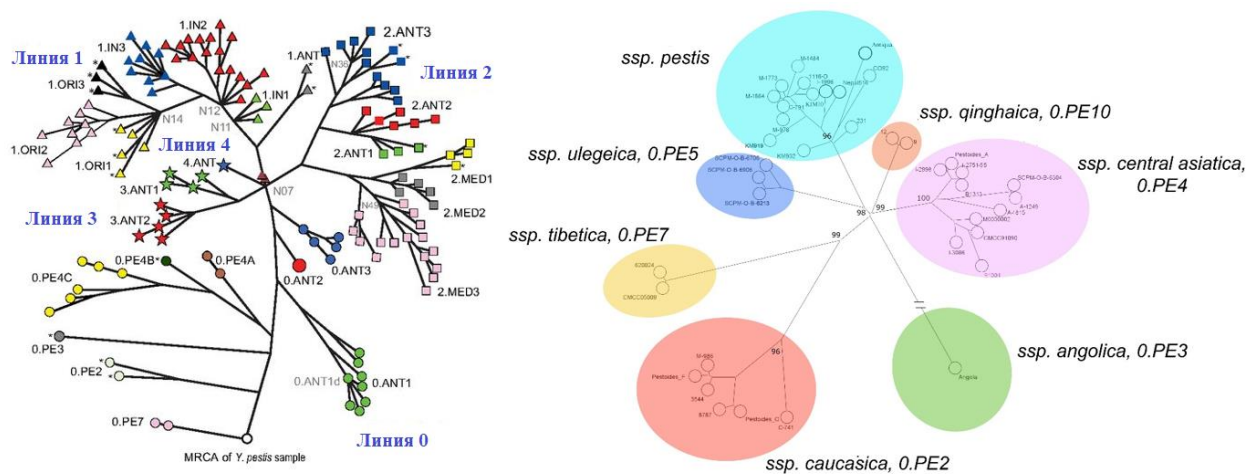


Рисунок 1.1 – Основные филогенетические линии и ветви *Y. pestis* [Cui et al., 2013] и усовершенствованная подвидовая классификация *Y. pestis* [Kutyrev et al., 2018]

Согласно усовершенствованной классификации, основанной на молекулярно-генетических данных с учетом биохимических свойств и эпидемической значимости штаммов [Ерошенко и др., 2015; Ерошенко и др., 2022; Kutyrev et al., 2018], вид *Y. pestis* делят на семь подвидов – основной (*ssp. pestis*), кавказский (*ssp. caucasica*, 0.PE2), ангольский (*ssp. angolica*, 0.PE3), центральноазиатский (*ssp. central asiatica*, 0.PE4), улегейский (*ssp.*

ulegeica, 0.PE5), тибетский (*ssp. tibetica*, 0.PE7), цинхайский (*ssp. qinghaica*, 0.PE10). Центральноазиатский подвида имеет в своем составе биовары: алтайский (*bv. altaica*, 0.PE4a), микротус (*bv. microtus*, 0.PE4m), гиссарский (*bv. hissarica*, 0.PE4h), таласский (*bv. talassica*, 0.PE4t). Основной подвида включает биовары эпидемически значимых штаммов *Y. pestis* – античный (*bv. antiqua*, 0.ANT – 4.ANT), средневековый (*bv. medievalis*, 2.MED), восточный (*bv. orientalis*, 1.ORI) и промежуточный (*bv. intermedium*, 1.IN) (Рисунок 1.1). Штаммы основного подвида высоко вирулентны, эпидемически значимы, распространены в различных природных очагах мира. Штаммы кавказского, тибетского, цинхайского и ангольского подвидов эндемичны для отдельных природных очагов преимущественно в Евразии и могут вызывать единичные случаи заболевания. И, наконец, до сих пор неизвестно ни одного случая заболевания чумой, вызванного центральноазиатским подвидом (включая все 4 биовара), из чего следует, что эти штаммы не имеют эпидемической значимости.

Одними из эволюционно древних и широко распространенных в природных очагах чумы мира являются штаммы *Y. pestis* античного биовара основного подвида, которые на филогенетическом дереве возбудителя чумы лежат в основании всех современных высоковирулентных штаммов основного подвида (Рисунок 1.1). Штаммы античного биовара являются эпидемически значимыми штаммами с высокой вирулентностью. В лабораторной диагностике штаммы античного биовара отличают от штаммов других биоваров и подвидов по комплексу биохимических признаков, таких как способность к ферментации глицерина, арабинозы и редукции нитратов и отсутствие ферментации рамнозы и мелибиозы [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013].

При рассмотрении популяционной структуры совокупность штаммов античного биовара делят на ряд отдельных филогенетических линий: 0.ANT – 4.ANT. В основании филогенетического дерева вида *Y. pestis* лежат штаммы линии 0.ANT, являясь предковыми формами для всех штаммов основного подвида. На основании сравнения древних и современных геномов возбудителя чумы высказано предположение о том, что предки современных штаммов 0.ANT и 1.ANT дали начало этиологическим агентам штаммам первой и второй пандемиям чумы [Ерошенко и др., 2023; Bos et al., 2011; Harbeck et al., 2013; Wagner et al., 2014; Spyrou et al., 2016; Eroshenko et al., 2017; Damgaard et al., 2018; Spyrou

et al., 2022]. Современные штаммы линии 0 античного биовара делятся на ряд филогенетических ветвей, характерных для территорий Китая (0.ANT1 – 0.ANT3) и Республики Кыргызстан (0.ANT3, 0.ANT5).

Штаммы 1.ANT эндемичны для территории Восточной и Центральной Африки, а именно Демократической Республики Конго (ДРК), Уганды, Кении, Танзании, Замбии [Heisch et al., 1953; Morelli et al., 2010; Respcio-Kingry et al., 2016; Nyirenda et al, 2016; Nyirenda et al., 2017]. В составе филогенетической линии 1.ANT выделены три филогенетические ветви: 1.ANT1, к которой относятся штаммы из ДРК и Уганды, а также 1.ANT2 и 1.ANT3, распространенные в ДРК и Кении [Morelli et al., 2010]. Предполагается, что ветвь 1.ANT1 возникла в Китае и была занесена на территорию Африки во время путешествий под руководством мореплавателя Чжэна Хэ между 1409 и 1433 годами, либо в результате заноса из Китая в Восточную Африку арабскими торговцами [Levathes, 1996; Morelli et al, 2010; Sussman, 2016; Green, 2018]. На основе данных палеогеномных исследований штаммов периода второй пандемии чумы высказано предположение о том, что ее этиологическим агентом являлись предки современных штаммов 1.ANT, вероятно циркулировавшие на территории существовавшего в то время природного очага в Европе, которые затем были занесены в Китай, где они уже дали начало линиям 1.IN и 1.ORI, причем последняя явилась этиологическим агентом третьей пандемии чумы [Spyrou et al., 2016; Spyrou et al., 2019]. Это также может говорить о возможном заносе штаммов возбудителя чумы 1.ANT на территорию Африки во время экспансии штаммов *Y. pestis* второй пандемии [Ерошенко и др., 2023; Spyrou et al., 2016; Spyrou et al., 2019].

Филогенетическое разнообразие второй линии эволюции античного биовара 2.ANT представлено ветвями 2.ANT1 – 2.ANT3, выявленными на территории Китая [Cui et al., 2013]. Помимо этой территории, имело место выделение штаммов ветви 2.ANT1 с приграничных с Китаем территорий Непала [Cui et al., 2013]. Кроме того, циркуляцию штаммов ветви 2.ANT3 в XX веке регистрировали на трансграничных природно-очаговых территориях Китая, Монголии и Российской Федерации [Куклева и др., 2013; Куклева и др., 2015; Cui et al., 2013]. Следует отметить, что именно штаммы ветви 2.ANT3 явились этиологическим агентом самой мощной и последней в XX столетии Маньчжурской эпидемии чумы, число жертв которой по разным оценкам варьирует от 60 до 100 тыс. человек [Pollitzer, 1951; Eroshenko, Kutuyev, 2018]. Кроме того, штаммы 2.ANT явились эволюционными предшественниками штаммов средневекового биовара (2.MED), получившими

распространение на обширных пространствах Восточной Европы и Центральной Азии в XX веке [Morelli et al., 2010; Cui et al., 2013; Eroshenko et al., 2021].

Ареал распространения штаммов линии 3.ANT ограничен территориями Китая (3.ANT1) и Монголии (3.ANT2) [Cui et al., 2013; Куклева, 2015]. Отличительной биохимической особенностью некоторых штаммов ветви 3.ANT2 является отсутствие характерной для других штаммов античного биовара способности редуцировать нитраты, что сближает их со штаммами средневекового биовара и может вызывать трудности при определении внутривидовой принадлежности по фенотипическим признакам [Ерошенко и др., 2014; Куклева и др., 2015]. У этих штаммов не было выявлено мутаций в генах *narA* и *ssuA*, ответственных за этот признак у штаммов средневекового, алтайского, гиссарского и *microtus* биоваров, что свидетельствует о существовании иных генетических причин отсутствия редукции нитратов у этой группы [Ерошенко, 2014; Deng et al., 2002; Zhou et al., 2004].

Особую актуальность имеет рассмотрение штаммов линии 4.ANT, которые циркулируют на территориях Российской Федерации и Монголии в активном в настоящий момент Тувинском горном, трансграничном Сайлюгемском, северной частью которого является Горно-Алтайский высокогорный очаг, и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан природных очагах чумы [Вержущкий, Адьясурэн, 2019; Попов и др., 2022]. Особенностью этих штаммов является присутствие в геноме дополнительной плазмиды рTP33 размером 33 т.п.н. [Балахонов и др., 1991; Балахонов и др., 2013; Оглодин и др., 2015; Афанасьев и др., 2016]. Тувинский горный очаг был открыт в 1964 г. и характеризуется постоянной эпизоотической активностью, связанной с циркуляцией штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара. На территории Монголии циркуляция штаммов филогенетической линии 4.ANT впервые была выявлена в 1982 г. в границах природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан [Балахонов и др., 1991]. На территории трансграничного Сайлюгемского природного очага, в состав которой входят эндемичная по чуме территория северо-запада Монголии и Горно-Алтайский высокогорный очаг Республики Алтай Российской Федерации, штамм *Y. pestis* линии 4.ANT был впервые выявлен в 2012 г. в российской части очага, в монгольской – в 2017 г. [Балахонов и др., 2013; Корзун и др., 2018]. Эпидемический потенциал этих природно-очаговых территорий подчеркивается постоянными эпизоотическими проявлениями и случаями заражений чумой человека. В Монголии на территории природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан в период с 1989 по 1998 гг.

регистрировали случаи заражения людей, последний случай произошел в 2017 г. В Сайлюгемском природном очаге в Монголии в 2019 г. зафиксированы два случая заболевания с летальным исходом [Вержущкий, Адьясурэн, 2019]. На территории Горно-Алтайского высокогорного очага в период с 2014 по 2016 гг. ежегодно регистрировали по одному случаю заболевания человека [Кутырев и др., 2014; Балахонов и др., 2016].

Таким образом, популяционная структура *Y. pestis* античного биовара характеризуется значительным генетическим разнообразием в сочетании с широкой географической распространенностью этих штаммов в очагах мира. Высокая эпидемическая значимость штаммов *Y. pestis* античного биовара определяет актуальность изучения их фенотипических и генетических особенностей, в частности, штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, циркулирующих в активных Горно-Алтайском высокогорном и Тувинском горном природных очагах Российской Федерации.

1.2 Современные представления об экологии и персистенции *Y. pestis* в природных очагах чумы

Ключевым событием в эволюции *Y. pestis* стал переход от фекального-орального пути передачи патогена к трансмиссивному через укусы блох. В его основе лежит способность возбудителя чумы образовывать биопленку в преджелудке блохи, блокируя ее питание [Bacot, Martin, 1914]. В отличие от своего потомка, *Y. pseudotuberculosis* не способен образовывать блок преджелудка блохи, несмотря на идентичность оперона, связанного с синтезом и экспортом внутриклеточного матрикса, и способность образовывать биопленку на разных биотических и абиотических поверхностях. Более того, *Y. pseudotuberculosis* провоцирует острую токсическую реакцию у блох, приводящую к высокой смертности в течение первых 24 ч, а у переживших первичные токсичные эффекты развивалась хроническая инфекция задней и реже средней кишки, но не преджелудка [Erickson et al., 2007; Erickson et al., 2006]. Выявлено, что причина фенотипического различия биопленкообразования между двумя родственными видами иерсиний заключается в псевдогенизации генов *rcaA* и *pde2* и *pde3* регуляторных систем образования биопленки у *Y. pestis* [Sun et al., 2008; Sun et al., 2014]. Кроме того, локализация *Y. pestis* в преджелудке блохи стала возможной благодаря приобретенному гену *ymt* плазмиды pFga, коди-

рующему фосфолипазу D, предположительно защищающую грамотрицательные бактерии от действия бактериолитического вещества, формирующегося в средней кишке блох при переваривании кровяной муки [Hinnebusch et al., 2002; Hinnebusch et al., 2016]. В то же время возбудитель чумы утратил токсичность в отношении блох в результате сдвига рамки считывания в гене *ureD* одного из ферментов синтеза уреазы, в активном состоянии разлагающей в желудке блохи мочевины до аммиака, который и провоцирует токсические для блох эффекты [Sebbane et al., 2001; Chouikha, Hinnebusch, 2014]. Также важным шагом для эффективной трансмиссии возбудителя стало развитие гипервирулентности, обеспечивающей достижение высоких показателей бактериемии, необходимой для эффективного инфицирования блох, питающихся на больном животном. Одним из факторов патогенности, ответственным за развитие легочной формы чумы, стало приобретение плазмиды pPst, несущей ген активатора плазминогена *pla*, в особенности вариант с мутацией I259T [Sebbane et al., 2020].

В результате произошедших молекулярных перестроек механизм трансмиссии возбудителя чумы реализуется следующим образом. В процессе кормления блох на больном животном возбудитель чумы попадает в организм блохи, размножается и в результате экспрессии генов *hmsHFRS*, *hmsT*, *hmsP*, *gmsA*, *speA*, *speC*, *ymt* образует биопленку на выростах кутикулы преджелудка – акантах [Jarett et al., 2004; Darby et al., 2005; Sun et al., 2008; Vobrov et al., 2008]. При кровососании блохи на новом млекопитающем ток крови смывает фрагменты биопленки возбудителя чумы из преджелудка блохи обратно в ранку, инфицируя животное. Этот механизм лежит в основе классической эпидемиологической модели чумы [Perry, Fetherston, 1997], поддерживая эпизоотическую активность природных очагов.

Многолетние наблюдения за динамикой активности природных очагов позволили установить определенную цикличность проявлений чумы на энзоотических территориях. Вслед за активными эпизоотиями, характеризующимися циркуляцией возбудителя чумы среди популяции грызунов и их массовой гибелью (эпизоотическая фаза), наступает депрессия очага (межэпизоотическая фаза), когда находки зараженных грызунов отсутствуют. В среднем эпизоотические проявления на территории очага могут отсутствовать в течение 5–10 лет, однако известны межэпизоотические периоды продолжительностью 57, 25 и 60 лет в Алжире, Ливии и на Мадагаскаре соответственно [Bertherat et al., 2007; Cabanel et al., 2013; Andrianaivoarimanana et al., 2013]. Это время значительно превышает

срок жизни блох и хозяев на территории природного очага и, следовательно, не может быть объяснено классической моделью чумы.

Основной гипотезой для объяснения персистенции *Y. pestis* между эпизоотиями в настоящее время рассматривается возможность сохранения возбудителя в инфицированных блохах (гипотеза устойчивого энзоотического хозяина), питающихся на гетерогенной популяции восприимчивых и относительно устойчивых хозяев [Акиев, 1989; Davis et al., 2004; Stapp et al., 2004; Gage, Kosoy, 2005; Kausrud et al., 2007; Eisen, Gage, 2009; Schmid et al., 2012; Boegler et al., 2012]. Однако ряд накопленных фактов вступают в противоречие с этим предположением, а именно: низкий уровень бактериемии резистентных хозяев, недостаточный для эффективного заражения блох [Lorange et al., 2005]; редкие случаи выявления серопозитивных грызунов и блох в межэпизоотические периоды; длительный срок межэпизоотических периодов (более 50 лет), превышающий продолжительность жизни блох и хозяев [Bertherat et al., 2007; Andrianaivoarimanana et al., 2013]. Также эта гипотеза не может объяснить «взрывное» начало эпизоотий, характеризующееся одновременной активизацией в различных участках природно-очаговой территории и высокой скоростью распространения эпизоотических проявлений. Кроме того, выявлено отсутствие связи между активизацией очага и численностью основных носителей и переносчиков, в то время как имели место одиночные заражения случайных носителей, в том числе и за пределами природного очага [Дятлов, 1982; Слудский, 2014].

За более чем полувековой срок изучения вопроса сохранения возбудителя чумы в межэпизоотический период и последующего механизма активизации эпизоотий в природных очагах были предприняты попытки объяснить эти явления заносами *Y. pestis* с других территорий («эстафетная» передача, перенос с птицами [Федоров, 1944; Фенюк, 1948; Калабухов, 1969; Шевченко и др., 1969; Шевченко, 1980]), циркуляцией возбудителя на ограниченных участках «тлеющих» очажков [Иофф и др., 1951; Наумов и др., 1959], изменением фенотипических и генетических свойств *Y. pestis* [Краминский, Домарадский, 1961; Зыкин, Дунаев, 1984; Сучков, Леви, 1997; Литвин, 1997; Домарадский, 1997], сохранением возбудителя в организме переносчиков (блох [Акиев и др., 1971], клещей [Кондрашкина и др., 1976]). Тем не менее, все эти гипотезы так и не дают объяснения особенностям, выявленным при изучении природной очаговости чумы.

В отдельную группу выделяются гипотезы, связанные с сохранением возбудителя в почве в свободном состоянии [Аууадурай et al., 2008; Eisen, Gage, 2009], в останках животных [Baltazard et al., 1963], трупах и фекалиях блох [Кондрашкина и др., 1976А; Величко и др., 1978; Свиридов и др., 1980]. Гипотеза «теллурической чумы» была высказана еще в 60-ых годах прошлого столетия, согласно которой возбудитель чумы существует в неустойчивой фазе, передаваясь по цепочке «грызун – блоха – грызун», и в устойчивой фазе почвы нор, в которой возбудитель чумы сохраняется в почве и трупах грызунов длительное время (до 28 месяцев в условиях эксперимента) [Baltazard et al., 1963, Mollaret et al., 1963; Karimi, 1963]. В экспериментах по культивированию *Y. pestis* в стерильной и нестерильной почве в разных температурных диапазонах и показателях увлажненности длительность сохранения *Y. pestis* в почве составляла от 112 суток до 8 лет [Mollaret, 1963; Mollaret, 1968; Тимофеева и др., 1966; Тимофеева и др., 1969; Тимофеева, Головачева, 1974; Тимофеева, Головачева, 1975; Тимофеева, Головачева, 1978; Вариводина и др., 1970; Васильев, 1970]. Также известны несколько случаев выделения возбудителя из почв [Yersin, 1899; Ларина и др., 1992; Eisen et al., 2008]. Однако достаточно часто при изучении вопросов сохранения возбудителя чумы в почве не принимается в расчет межпопуляционные связи почвенных организмов. Наибольшее влияние бактериальная популяция будет испытывать от воздействий бактериоцидных организмов, к которой относятся представители почвенной микрофауны. Под микрофауной подразумевается совокупность организмов размером менее 0,2 мм, а именно простейшие и нематоды [König, Varma, 2006]. Именно эти организмы могут быть рассмотрены в качестве промежуточного хозяина, способного обеспечить длительное сохранение *Y. pestis* в почве и оказывать значительное влияние на жизненный цикл возбудителя чумы [Литвин, 2003; Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Laudisoit, 2009].

Простейшие играют важную роль для патогенных микроорганизмов. Известно, что некоторые бактериальные патогены (*L. pneumophila*, *M. marinum*, *V. cholerae*) демонстрируют устойчивость к перевариванию простейшими и могут использовать клетки простейших в качестве репликативных ниш [Cirillo et al., 1994; Al-Quadani et al., 2012; Abd et al., 2007; Kennedy et al., 2012]. Также амебы могут служить защитным резервуаром, предохраняя клетки бактерий от пагубных воздействий внешней среды, в том числе благодаря двухслойной оболочке цист, и могут способствовать передаче патогенов восприимчивым

хозяевам [Brieland et al., 1997; Greub, Raoult, 2004; Al-Quadani et al., 2012]. Тактика использования клеток простейших в своем жизненном цикле может быть актуальна и для возбудителя чумы. Известно, что амёбы, как и макрофаги, поглощают бактерии путем фагоцитоза. В то же время *Y. pestis* обладает механизмами, позволяющими ей избегать переваривания внутри макрофагов, реплицироваться в них и выходить из этих клеток [Pujo, Bliska, 2003; Huang, Lindler, 2004; Ke et al., 2013]. Вполне возможно, что возбудитель чумы может использовать сходные механизмы в своем взаимодействии с амёбами, используя их в качестве природного резервуара. Результаты исследований, доказывающих сохранение возбудителя чумы в ассоциации с простейшими *H. rhyssodes* [Никульшин и др., 1992], инфузорий *T. pyriformis* [Пушкарева, 2003; Бренева и др., 2005], *D. discoideum* [Markman et al., 2018], *A. castellanii* [Кошель и др., 2016; Оглодин и др., 2017; Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017] от 2 дней до 14 месяцев, являются основой для выдвижения гипотезы о сохранении возбудителя чумы в почвенных биоценозах в ассоциациях с простейшими [Литвин, 2003; Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Laudisoit, 2009].

Ранее понимание роли биопленок в жизненном цикле *Y. pestis* ограничивалось участием в блокировании у блох и сохранением возбудителя чумы в составе фекалий блох. Новым толчком в изучении механизма энзоотии чумы стало открытие способности возбудителя чумы образовывать биопленку на кутикуле и внутренних поверхностях нематод [Видяева и др., 2009; Ерошенко Г.А., 2012; Darby et al., 2002; Joshua et al., 2003]. В совокупности с вышеупомянутым фактом и существованием нематод-паразитов блох была выдвинута гипотеза об их участии в переносе возбудителя чумы из почвы в блох, получившая название гипотезы вертикальной трансмиссии [Рубцов, 1981; Попов и др., 2006; Попов и др., 2007; Попов и др., 2008; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011]. Согласно этой гипотезе, при контакте с возбудителем чумы в почвенном биоценозе паразитические нематоды в соответствии со своим жизненным циклом инфицируют личинки блох. Во время метаморфозов насекомого возбудитель чумы блокирует преджелудок и получает способность заражать носителей. Таким образом реализуется схема «биопленка – личинка энтомопаразитической нематоды – личинка блох – куколка блох – имаго блох – грызун», приводящая к первичным заражениям грызунов. Далее при увеличении числа инфицированных носителей и переносчиков эпизоотический процесс реализуется согласно классической схеме горизонтальной трансмиссии посредством циркуляции возбудителя чумы по цепочке «грызун – блоха – грызун».

Принимая во внимание возможность сохранения возбудителя чумы в клетках простейших во время межэпизоотических периодов, наступление благоприятных условий окружающей среды (повышение температуры, увеличение уровня влажности) будет способствовать активизации взаимодействий между клетками возбудителя чумы и простейшими, увеличению частоты фагоцитирования и размножения клеток возбудителя и увеличения вероятности встречи с личинками энтомопаразитических нематод [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011]. Именно сочетание благоприятных климатических факторов, обеспечивающих оптимальные условия для формирования биопленок чумного микроба и существования простейших, нематод, личинок блох, является ключевым для активизации эпизоотической активности очага. Достижение максимальной численности и концентрации популяций организмов на ограниченных участках объясняет «взрывной» сезонный и ежегодный характер начала эпизоотий во многих отдельных микроочагах и их приуроченность к определенным ландшафтам с высокой влажностью. Кроме того, трансларвальный механизм передачи возбудителя позволяет вовлекать в этот процесс не только специфичных переносчиков, но и блох неосновных носителей, что объясняет находки павших случайных носителей в начале эпизоотий. Интенсивность процессов возобновления возбудителя чумы в почве может влиять на частоту и эффективность заражения носителей, тем самым объясняя выявление как одиночных находок павших грызунов, так и массовых заражений фоновых видов носителей и переносчиков.

Таким образом, в настоящий момент гипотеза вертикальной трансмиссии в совокупности с возможностью сохранения возбудителя чумы в клетках простейших объясняет все пространственно-временные особенности проявления чумы в природных очагах и является одной из наиболее перспективных гипотез, проясняющих персистенцию возбудителя чумы в течение межэпизоотических периодов с последующей активизацией эпизоотического процесса, дополняя известный механизм энзоотий чумы. В целях получения сведений, доказывающих или опровергающих эту гипотезу, необходимо изучение видового состава представителей почвенной микрофауны природных очагов чумы и особенностей их взаимодействий с *Y. pestis*.

1.3 Взаимодействие возбудителя чумы с членами почвенных биоценозов

Почвенный биоценоз представляет собой совокупность микроорганизмов, животных, растений, грибов, населяющих однородный участок почвы и имеющих определенные отношения между собой и с окружающей средой. Попадая в почву с останками трупов носителей, переносчиков и продуктами их жизнедеятельности, *Y. pestis*, как и любая другая бактерия, неизбежно сталкивается с наиболее массовыми бактериоидными группами организмов – простейшими и нематодами. По причине соотносимости размеров (одноклеточные протисты имеют размер от ~ 2 мкм до более 50 мкм, нематоды – от ~ 30 мкм до 1 мм) эти организмы способны влиять на бактериальные сообщества, стимулируя либо тормозя бактериальные процессы [Rønn et al., 2012]. Однако взаимоотношения простейших и нематод с бактериями намного сложнее отношений «хищник-жертва», и охватывают весь спектр симбиотических отношений, начиная от антагонизма и заканчивая мутуализмом [Strassmann, Shu, 2017].

Простейшие являются повсеместно распространенными организмами, освоившими все среды обитания. В почвах широко распространены простейшие (голые и раковинные амёбы, инфузории), для которых характерен тип питания на прикрепленных бактериях, в том числе в биопленках [Хаусман и др., 2010]. Показано, что *A. castellanii* и инфузории *Colpoda taupasi* способны значительно влиять на динамику смешанного биопленочного сообщества бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* и *Staphylococcus epidermidis*, при том, что повсеместно распространенные в окружающей среде *A. castellanii* поглощали до 30000 клеток/см² в час и становились частью этого сообщества [Huws et al., 2005]. Предположительно, способность *A. castellanii* воздействовать на биопленку может быть связана с работой ферментов альгинатлиазы, разлагающих альгинат матрикса биопленки и обеспечивающих доступ простейшим внутрь биопленок [Anderson et al., 2005], и цистеиновых протеаз, расщепляющих белковый внеклеточный матрикс, одновременно являющихся факторами патогенности этих простейших, обеспечивающих инвазию в ткани [Wang et al., 2020]. В то же время между членами мультивидовой бактериальной биопленки, состоящей из *Xanthomonas retroflexus*, *Stenotropomonas rhizophila*, *Microbacterium oxydans* и *Paenibacillus amylolyticus*, формируются синергические взаимодействия, благодаря которым хищничество амёб *T. pyriformis* стимулирует продукцию биопленки ее наиболее активными продуцентами, тем самым защищая себя и

других членов сообщества и повышая общую приспособленность и бактериальное разнообразие [Raghupathi et al., 2018]. Несмотря на отсутствие данных касательно эффективности выедания простейшими биопленок *Y. pestis*, вышеперечисленные факты подтверждают наличие у почвенных простейших механизмов, благодаря которым они могут влиять на популяцию возбудителя чумы и одними из первых способны вступать в контакт с отдельными клетками или биопленками возбудителя чумы.

Селективность питания простейших обусловлена физическими ограничениями ротового аппарата, однако у биопленко-ассоциированных простейших захват пищи осуществляется путем фагоцитоза, что снимает ограничения на размер фагоцитируемых частиц [Ekelund, Rønn, 1994]. Также отсутствие подвижности у *Y. pestis* увеличивает эффективность питания ими простейших. В основе избирательного питания простейшими может лежать избегание простейшими токсических веществ, продуцируемых некоторыми бактериями [Jousset et al., 2008; Pedersen et al., 2011]. В случае возбудителя чумы этого эффекта не установлено, напротив, амёбы *Hartmannella rhysodes* и *Vahlkampfia hartmanni* проявляли положительный таксис к клеткам штамма *Y. pestis* EV, захватывая клетки бактерий и погружая их в цитозоль в составе фагосом [Никульшин и др., 1992].

Согласно механизму фагоцитоза, переваривание клеток бактерий в составе фагосом происходит за счет лизосомальных ферментов, в то время как в случае с возбудителем чумы слияния фаго- и лизосомы не происходит. Напротив, большинство бактериальных клеток локализуются вне лизосомальных компартментов клетки амёбы в просторных вакуолях, в которых содержатся от 2 до 10 морфологически неизменных бактерий, часть из которых находится в состоянии деления [Никульшин и др., 1992; Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017]. Отмечалось также, что клетки возбудителя чумы могут выходить из амёб и реплицироваться внеклеточно, а затем повторно заражать амёб [Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017]. Аналогичная стратегия избегания фагоцитоза внутри макрофагов и амёб используется патогенными бактериями *L. pneumophila*, *F. tularensis* и *S. jejuni* [Bozue, Johnson, 1996; El-Etr et al., 2009; Olofsson et al., 2013].

По причине того, что процесс захвата и переваривания бактерий путем фагоцитоза сближает простейших с макрофагами, предполагается, что при заражении амёб клетками *Y. pestis* могут быть задействованы те же молекулярные механизмы, что и в случае инфицирования макрофагов млекопитающих [Al-Quadani et al., 2012; Shi et al., 2021]. Экспериментально доказано, что активатор транскрипции PhoP и система секреции третьего типа

(T3SS), являющиеся ключевыми детерминантами внутриклеточного взаимодействия возбудителя чумы и фагоцитирующих макрофагов, играют немаловажную роль при взаимодействии *Y. pestis* с амебами [Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017]. Мутантные штаммы с инактивированным геном PhoP теряют способность выживать при сокультивировании с амебами, что соответствует процессам, происходящим при взаимодействии *Y. pestis* с макрофагами. При активации T3SS происходит прекращение фагоцитарного поглощения клеток возбудителя чумы амебами, аналогично тому, что происходит при заражении макрофагов. Следует заметить, что активизация T3SS происходит при 37 °С, в то время как встреча амеб и клеток возбудителя чумы в окружающей среде происходит при меньших температурах, за исключением ситуации, при которой в организм млекопитающих могут попасть инфицированные *Y. pestis* простейшие. В остальных случаях T3SS в условиях окружающей среды инактивирована и не будет влиять на взаимодействия амеб и *Y. pestis*. Известным механизмом, используемым возбудителем чумы для предотвращения закисления фагосомы и последующего за этим лизосомального переваривания, является использование белка Rab1b ГТФаз клетки макрофага [Connor et al., 2015]. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена с полными геномными последовательностями *A. castellanii* и *D. discoideum* было обнаружено сходство последовательностей 99,8 %. Для установления функциональной ортологичности продуктов этих генов в амебах и макрофагов требуется проведение дальнейших исследований [Markman et al., 2019].

Помимо клеток простейших в качестве репликативной ниши, возбудитель чумы может использовать клетки простейших и для переживания неблагоприятных условий окружающей среды. Уникальной особенностью ряда простейших является способность замедлять метаболические процессы, переходя в инцистированное состояние. Показано, что при культивировании амеб *H. rhyodes* на газоне *Y. pestis* EV инцистирование основной массы амеб происходит на 2–3 сут, в то время как в жидкой среде образование цист *A. castellanii* с находящимися внутри клетками *Y. pestis* 367 происходит на 3–4 сут [Никольшин и др., 1992; Оглодин и др., 2017]. К моменту инцистирования основная масса бактерий переваривается амебами, однако в цитоплазме отмечается сохранение единичных клеток бактерий возбудителя чумы в индивидуальных вакуолях, окруженных эндоплазматическим ретикуломом [Никольшин и др., 1992; Кошель и др., 2016; Оглодин и др., 2017]. Также были отмечены случаи гибели отдельных амебных клеток, переполненных клетками *Y. pestis*, и выходом клеток бактерий в окружающую среду [Никольшин и др.,

1992; Оглодин и др., 2017]. Кроме цистообразующих амёб к сохранению возбудителя чумы способны социальные гетерогамные амёбы *D. discoideum*, внутри спор которых *Y. pestis* CO92 может выживать и размножаться при сроках не менее 48 ч после заражения [Markman et al., 2019].

Для изучения процессов, связанных с сохранением этиологического агента чумы в межэпизоотические периоды, особое значение имеют исследования способности *Y. pestis* выживать в клетках простейших в течение длительного промежутка времени. При культивировании возбудителя чумы с клетками *T. pyriformis* бактерии переходили в некультивируемую форму и сохранялись в инфузориях до 14 месяцев, регистрируясь только методом ПЦР [Пушкарева, 2003]. При моделировании засушливых климатических условий окружающей среды (при температуре 26 °С и 20 % влажности воздуха) было показано, что штаммы возбудителя чумы основного подвида сохраняются в клетках амёб на протяжении 2–4 месяцев, выделяясь бактериологически, что в 10–20 раз дольше, чем в чистой культуре [Кошель и др., 2016]. В искусственной почвенной системе при сокультивировании *Y. pestis* с инфузориями *T. pyriformis* установлено сохранение высоковирулентного штамма бактерий до семи недель [Бренева, Марамович, 2008].

Сохранение бактерий в простейших может зависеть от генетических особенностей штамма. Установлено, что штаммы *Y. pestis*, лишённые основных плазмид, исчезают из ассоциации с простейшими через 4 ч, в то время как штаммы бактерий с полным плазмидным профилем сохранялись до 15 сут [Пушкарева, 2003]. При моделировании засушливых условий выявлено различие в длительности сохранения штаммов основного и неосновного подвида, что может быть связано с наличием альтернативного механизма сохранения. Так, штаммы неосновного подвида способны продуцировать массивную биопленку, предохраняющую бактерии от высыхания и неблагоприятных воздействий окружающей среды, таким образом, не нуждаясь в образовании ассоциаций с почвенными амёбами, что подтверждается установленной пониженной резистентностью к фагоцитированию простейшими. В то же время штаммы основного подвида могли выбрать другую стратегию переживания неблагоприятных периодов, используя для этого ассоциации с простейшими, увеличивая длительность своего выживания в 10–20 раз [Кошель и др., 2016].

Еще одной группой организмов, с которой возбудителя чумы может столкнуться в почвенном биоценозе, являются нематоды, широко распространенные в почвенных биоценозах. Свободноживущие нематоды оказывают значительное влияние на почвенный биоценоз, принимая активное участие в деструкции органических останков и, наравне с простейшими, выступая основным регулятором численности бактериальных популяций [Yeates, Coleman, 1982]. Являясь бактериоядными организмами, нематоды могут напрямую контактировать как с отдельными клетками *Y. pestis*, так и с клетками в составе бактериальной биопленки. Благодаря своим превосходящим размерам бактериоядные нематоды не так тесно контактируют со своей жертвой, результатом чего становится отсутствие активной селекции бактерий и основным ограничением служит размер ротового аппарата нематод [Avery, Shtonda, 2003]. В то же время ограниченные сведения свидетельствуют о наличии пищевых предпочтений в отношении определенных бактерий, регулируемых реакциями хемотаксиса [Salinas et al., 2007]. Кроме того, нематоды вместе с бактериальными биопленками могут поглотить и находящиеся там клетки амёб. В экспериментальных условиях установлено, что *Caenorhabditis elegans* может быть инфицирован *L. pneumophila*, содержащимися в поглощенных и перетертых с помощью ротового аппарата нематоды клетках амёб, в результате чего клетки бактерий колонизировали кишечный тракт нематод [Rasch et al., 2016].

Известно, что взаимодействие *Y. pestis* и нематод обусловлено образованием массивной биопленки на кутикуле нематод, вероятно, при контакте нематоды во время движения с отдельными клетками или биопленкой возбудителя чумы [Darby et al., 2002; Joshua et al., 2003; Ерошенко и др., 2012]. Биопленку регистрировали в области половых органов, на кончике хвоста, однако патогенное воздействие *Y. pestis* связывают именно с локализацией биопленки в области головы. В этом случае богатая полисахаридами матрица биопленки блокирует питание нематод, приводя к гибели [Darby et al., 2002; Tan, Darby, 2004]. Для образования биопленки необходимы гены *hms*-оперона, при том что утрата всей области пигментации, в которой он расположен, как и точечные мутации в генах приводят к потере способности формировать биопленку на кутикуле нематоды *C. elegans* [Darby et al., 2002, Ерошенко и др., 2012]. Утрата плазмид *Y. pestis* не влияет на формирование биопленки на нематодах [Ерошенко и др., 2012]. Известно, что нематоды могут быть устойчивы к образованию на них биопленки. На модельном организме *C.*

elegans было установлено, что мутации в генах нематод *srf-2*, *srf-3* и *srf-5* изменяют поверхностные характеристики кутикулы и предотвращают адгезию бактерий, как и в генах *bus*, *bah-1*, *bah-2*, *bah-3* [Joshua et al., 2003; Darby et al., 2005].

Кроме образования биопленки возбудитель чумы может вызывать гибель нематод с помощью токсин-опосредованного механизма, который связан с накоплением возбудителя в кишечнике. Выявлено, что мутации в генах *ompT*, *y3857* и *yapH*, связанные с вирулентностью других бактериальных патогенов, а также в генах *y0340*, *y1021*, *y2663*, *y3913*, *y0941*, *y4018* аттенуируют их вирулентность для нематод. Также установлено, что факторы вирулентности, закодированные в плаزمиде рCD1 и рPCP1, не влияют на вирулентность *Y. pestis* для *C. elegans* [Styer et al., 2005].

Следующей группой организмов, потенциально способных вступать во взаимодействие с *Y. pestis* и оказывать влияние на эпизоотический процесс в природных очагах чумы, являются нематоды, паразитирующие в блохах. Спектр нематод-паразитов блох включает мелких спирурид, филяриат (отр. Filariida и Spirurida), представителей мерметид (сем. Mermithidae) и наиболее часто встречаемых в блохах представителей родов *Psyllotylenchus*, *Howardula*, *Neoparasitylenchus*, *Bradynema*, *Aphanitylenchus*, *Spilotylenchus*, *Rubzovinema* отряда Tylenchida [Рубцов, 1981; Слободянюк, 1991; Koshel et al., 2014]. На территории Волго-Уральского степного и Горно-Алтайского высокогорного природных очагов чумы Российской Федерации был выявлен полигостальный вид энтомопаразитических нематод *R. polyxenica*, паразитирующий на 6 видах блох (*C. tesquorum*, *Amphipsylla rossica*, *Ctenophthalmus secundus*, *A. primaris primaris*, *Rhadinopsylla li transbaicalica*, *R. dahurica*) [Ерошенко и др., 2016; Оглодин и др., 2018; Koshel et al., 2014]. Отсутствие строгой гостальной специфичности и широкое распространение этого вида обеспечивает универсальность инвазии этими нематодами и повышает их значимость в природных очагах.

Предполагается, что паразитические нематоды могут принимать участие в распространении возбудителя чумы в пределах почвенного биоценоза и выносе за его пределы согласно гипотезе вертикальной трансмиссии. В соответствии с жизненным циклом нематод, эти организмы на личиночной стадии инфицируют личинки блох и затем локализуются в гемоцеле насекомого. Благодаря способности прикрепляться к поверхностным и внутриполостным структурам нематод в виде биопленок, *Y. pestis* может выноситься в

наземный биоценоз при помощи трансларвальной передачи бактерий нематодами блохам, которые в свою очередь трансмиссивно заражают млекопитающих [Попов и др., 2006; Попов и др., 2007; Попов и др., 2008; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011]. Основным положением этой гипотезы является способность возбудителя чумы образовывать биопленку на кутикуле нематод [Видяева и др., 2009; Ерошенко Г.А., 2012; Darby et al., 2002; Joshua et al., 2003], в то время как возможность сохранения и распространения иерсиний в составе нематод косвенно доказывают взаимоотношения *Y. pseudotuberculosis* в комплексе с личинками насекомых *Galleria mellonella*, энтомопатогенными нематодами *Steinernema* и их естественным симбионтом *Xenorhabdus* [Gengler et al., 2015]. Установлено, что при внесении *Y. pseudotuberculosis* в кишечник нематод *Steinernema sp.* либо в гемоцель личинки большой восковой моли нематоды осуществляли перенос *Y. pseudotuberculosis* в полость тела личинки насекомого, где бактериальные клетки успешно размножились и снова населяли энтомопатогенных нематод, которые перенесли *Y. pseudotuberculosis* в новую личинку насекомого на протяжении как минимум 7 инфекционных циклов на протяжении 14 недель. Если в аналогичных экспериментах *Y. pestis* сможет колонизировать энтомопаразитических нематод и противостоять антимикробным веществам, продуцируемым гипотетическими эндосимбионтами, то эти результаты дадут новое понимание долговременной персистенции в эндемичных очагах чумы и будут служить доказательством гипотезы вертикальной трансмиссии.

Помимо возможного прямого воздействия на возбудителя чумы, играя роль в выносе из почвенного биотопа в наземный, энтомопаразитические нематоды способны косвенно оказывать воздействие на возбудителя чумы через нематод, влияя на их репродуктивную способность носителей и приводя к гибели имаго. В совокупности с высоким уровнем зараженности блох нематодами, у ряда видов достигающим 35 %, нематоды рассматриваются в качестве естественных регуляторов численности блох, способных влиять на интенсивность эпизоотических процессов в природных очагах чумы [Ерошенко и др., 2016; Koshel et al., 2014]. В то же время механизмы, приводящие к кастрации и интерсексуальности блох паразитическими нематодами, остаются неизвестными. Возможно, в этом процессе может участвовать бактериальная микробиота, в том числе ассоциированная с паразитическими нематодами. Примером такого взаимодействия является симбиоз бактерий *Xenorhabdus* и *Photorhabdus* с энтомопатогенными нематодами *Steinernema* и

Heterorhabditis, при котором патогенное действие на насекомых оказывают именно бактерии-симбионты [Goodrich-Blair, Clarke, 2007]. Тем не менее состав и значение микробных сообществ паразитарной системы «блоха-нематода» остаются в значительной степени неизвестными, несмотря на возможное влияние этой системы на эпизоотические процессы в природных очагах чумы.

Кроме того, изучение микробиома этой системы важно с точки зрения описания микроокружения, в котором может быть выявлена *Y. pestis*. В том числе значительный вклад внесло бы обнаружение специфичного для блох или энтомопаразитических нематод эндосимбионта, способного ингибировать рост возбудителя чумы. Известно, что сообщества бактерий, входящие в состав микробиома блох, варьируют не только между особями одного вида, но также между отдельными популяциями внутри вида [Jones et al., 2010; Jones et al., 2012]. Различия в составе микробиома могут влиять на разные аспекты жизнедеятельности блох, в том числе и эффективность передачи возбудителя чумы. Изучение композиционного состава бактерий и взаимодействий между ними, возбудителем чумы, паразитическими нематодами и блохами может иметь решающее значение для более глубокого понимания экологии чумы и может в конечном итоге привести к лучшему прогнозированию вспышек чумы [Jones et al., 2013]. Установлено, что возбудитель чумы способен изменять бактериальные сообщества блох, оказывая влияние на численность определенных бактериальных линий [Jones et al., 2013]. Так, у инфицированных *Y. pestis* блох значительно снизилась численность грамположительных Firmicutes, в то время как численность грамотрицательных Proteobacteria увеличилась. Продукция бактериоцина пестицина возбудителем чумы не может объяснить это явление, поскольку он не оказывает влияния на грамположительных и ряд грамотрицательных бактерий [Brubaker, 1991]. Другими возможными объяснениями могут служить существование иного бактериоцина, воздействующего на грамположительные бактерии, влияние чувства кворума *Y. pestis* на другие популяции бактерий, физиологический или иммунный ответ блох на инфицирование возбудителем чумы косвенно влияет на все сообщество бактерий в целом [Jones et al., 2013].

В контексте изучения вопроса сохранения *Y. pestis* в межэпизоотические периоды важным является рассмотрение продолжительности жизни нематод и сохранения в них бактерий. Известно, что при наступлении неблагоприятных условий (высокая или низкая температура, низкий уровень влажности, высокая плотность популяции) нематоды отряда

Rhabditida на личиночной стадии способны переходить в альтернативную стадию развития (личинка дауэра), замедляя свой метаболизм [Riddle et al. 1981]. Как было показано для модельного объекта *C. elegans* продолжительность жизни вместо среднего показателя в 3 недели увеличилась до 18 недель [Mayer, Sommer, 2010], при введении в анабиоз личинки дауэра *C. elegans* высушиванием с последующим замораживанием удалось добиться сохранения жизнеспособности на протяжении более 16 месяцев [Shatilovich et al., 2023]. Также о беспрецедентных способностях сохранения жизнеспособности нематод говорит выделение нематоды *P. kolytaensis* из вечной мерзлоты, остававшейся в состоянии криптобиоза на протяжении 46000 лет [Shatilovich et al., 2018; Shatilovich et al., 2022]. Что касается бактерий, то в зависимости от температуры, при которой были инкубированы нематоды *Steinernema sp.* MW8B в физрастворе (4 °C и 16–28 °C) длительность сохранения клеток *Y. pseudotuberculosis* в желудочно-кишечном тракте нематод варьировала от 6 недель до 14 недель соответственно [Gengler et al., 2015]. Длительное сохранение бактерий внутри нематод возможно благодаря наличию защитной кутикулы и запасу липидов, благодаря которым энтомопатогенные нематоды *S. glaseri* на стадии инфекционной молодежи способны выживать в почве на протяжении нескольких месяцев [Abu Hatab et al., 1998; Gengler et al., 2015].

Помимо описанных взаимодействий, нельзя не упомянуть о возможной роли простейших и нематод в эволюции и становлении *Y. pestis* как патогена. Бактериоядные простейшие рассматриваются в качестве «тренировочных площадок» и «тройных коней», внутри которых может проходить отбор наиболее вирулентных форм бактерий для простейших и макрофагов млекопитающих, размножение, сохранение с последующим распространением в окружающей среде [Barker, Brown, 1994; Molmeret et al., 2005]. О сходных процессах внутри рода *Yersinia* свидетельствует эффект повышения вирулентности после пассирования на инфузориях, аналогичный таковому после прохождения через перитонеальные макрофаги морских свинок и белых мышей [Литвин, Пушкарева, 1994]. Кроме того, простейшие могут служить «плавильными котлами», внутри которых бактерии, находящиеся в одной вакуоли или любом другом компартменте клетки, могут обмениваться генами и плазмидами между собой и организмом-хозяином, в том числе и генами устойчивости к антибиотикам [Moliner et al., 2010; Bertelli, Greub, 2012; Gomez-Valero, Buchrieser 2013; Cairns et al., 2018; Nguyen et al., 2020]. Помимо амёб, интенсифицировать процесс горизонтального переноса генов может образование биопленок, внутри

которых увеличивается частота бактериальной конъюгации по сравнению с планктонными формами [Hausner, Wuertz, 1999]. Конъюгативный обмен плазмид антибиотикорезистентности между *Y. pestis* и *E. coli* был зафиксирован в средней кишке блох в агрегатах, окруженных внеклеточным матриксом, напоминающих биопленку [Hinnebusch et al., 2002]. Исходя из этого можно предположить, что перенос генов может происходить также в биопленках, образованных на внешних и внутренних поверхностях нематод. Это дает возможность для выдвижения новых гипотез о происхождении плазмид возбудителя чумы. Выявлено сходство видоспецифичной плазмиды pFga возбудителя чумы с плазмидами *Salmonella enterica* ser. Typhi и бактерий рода *Photobacterium* [Prentice et al., 2001; Duchaud et al., 2003; Wilkinson et al., 2009], при том, что последние известны в качестве эндосимбионтов энтомопатогенных нематод и провоцируют гибель насекомых. Кроме того, характерная для штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT плазида pTP33 содержит в своем составе участки, по аминокислотным последовательностям гомологичные фрагментам фагов бактерий-симбионтов насекомых *Sodalis glossinidius* и симбионтов энтомопатогенных нематод *P. asymbiotica*, *P. luminescens*, *X. bovienii* [Афанасьев и др., 2016]. Присутствие в составе плазмиды этих участков может свидетельствовать о контакте предковой формы *Y. pestis* этой филогенетической линии с сообществом организмов «насекомые – энтомопатогенные нематоды – бактериальные симбионты – бактериальные фаги». Все эти факты в совокупности лишней раз подчеркивают тесные связи между *Y. pestis* и почвенной микрофауной и возможную роль в эволюции возбудителя чумы.

Таким образом, рассмотренные сведения подтверждают существование взаимоотношений между *Y. pestis* и почвенными простейшими и нематодами. Простейшие могут выступать в качестве репликативной и защитной ниш для возбудителя чумы, обеспечивая сохранение до 14 месяцев, тогда как почвенные нематоды могут принимать участие в персистенции и распространении возбудителя чумы в почвенном биотопе. В этой связи актуальным является изучение видового состава почвенных простейших, свободноживущих нематод и нематод-паразитов блох, циркулирующих на территориях различных природных очагов. Кроме того, необходимо более полное изучение особенностей и закономерностей их взаимодействий, оценка оказываемого возбудителем чумы эффекта на исследуемый организм, в том числе и на молекулярном уровне, который остается практиче-

ски неизученным. При рассмотрении вопроса сохранения *Y. pestis* в течение межэпизоотических периодов, важным является изучение долговременных взаимодействий организмов на молекулярном, организменном и популяционном уровнях. Особое значение для понимания механизмов энзоотии чумы имеет изучение взаимодействий организмов, выделенных на территории одного биоценоза. Количество таких работ ограничено [Кошель и др., 2016; Оглодин и др., 2017] несмотря на то, что понимание закономерностей взаимоотношений организмов, являющихся членами устойчивого сообщества, поможет лучше раскрыть механизм сохранения возбудителя и инициации эпизоотических процессов в природных очагах чумы. Особенно актуально изучение взаимодействий организмов с территории активных в настоящее время в России природных очагов чумы, к которым относятся Горно-Алтайский высокогорный и Тувинский горный очаги.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы бактерий, использованные в работе, и условия их культивирования

Культивирование штаммов *Y. pestis* проводили в течение 24 – 48 ч при 28 °С или 37 °С на плотной и жидкой средах LB (рН 7,2). В работе использовали 39 штаммов *Y. pestis*, 1 штамм *Y. pseudotuberculosis* и 1 штамм *Escherichia coli*. Работу с культурой *Y. pestis* вели в соответствии с санитарными правилами и нормами 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". Сведения по использованным штаммам приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Штаммы бактерий, использованные в работе

№	Штамм	Регион выделения / очаг	Год, объект выделения
1	2	3	4
1	938 (1435)	Кыргызстан / Аксайский высокогорный (33)	1955 г., серый сурок <i>Marmota baibacina</i>
2	A-744	—«—	1963 г., серый сурок <i>M. baibacina</i>
3	14/1646 [14/1646]	—«—	1959 г., серый сурок <i>M. baibacina</i>
4	KM2080 (48)	Кыргызстан / Верхненарынский высокогорный (32)	2015 г., серый сурок <i>M. baibacina</i>
5	Congo Logo [Congo belge Logo]	Конго	1968 г., получен
6	Kenya Osala	Кения	1968 г., получен от Н. Mollaret
7	Kenya и То-То	—«—	1968 г., получен от Н. Mollaret
8	Kenya Ackliora	—«—	1968 г., получен от Н. Mollaret
9	102 Kenya	—«—	1968 г., получен от Н. Mollaret
10	171 (256) Маньчжурия	Китай (Внутренняя Монголия)	1928 г., вши
11	172 (257) Маньчжурия	—«—	1928 г., человек
12	173 (258) Маньчжурия	—«—	1928 г., человек
13	918 (P-47) Китай	Китай	1952 г., суслики
14	919 (P-82) Китай	—«—	1953 г., серая крыса <i>Rattus norvegicus</i>
15	920 (P-100) Китай	—«—	1954 г., суслики
16	И-3101 [37]	Монголия, аймак Хэнтий	1987 г., вши
17	И-3102 [86]	—«—	1984 г., содержимое гнезда длиннохвостого суслика <i>Spermophilus undulates</i>

Продолжение Таблицы 2.1

1	2	3	4
18	И-3033 [99]	—«—	1983г., тарбаган <i>M. sibirica</i>
19	231 (14) Монголия [231(14)]	—«—	1931 г., человек
20	137 (19) Берлин Монго- лия [137 (19 Берлин)]	Монголия	1932 г., тарбаган <i>M. sibirica</i>
21	236 (22) Монголия [236(22)]	Монголия, аймак Завхан	1936 г., тарбаган <i>M. sibirica</i>
22	235 (21) Монголия [235(21)]	—«—	1936 г., человек
23	И-839	Монголия, аймак Увс	1960 г., монгольская пищуха <i>O. pallasi pallasi</i>
24	И-3240	Монголия, аймак Баян-Улгий	1988 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
25	КМ1190 (И-3244)	—«—	1988 г., пищуха даурская <i>Ochotona dauurica</i>
26	И-3647	—«—	2018 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
27	И-3662	—«—	2018 г., остаток стола хищной птицы
28	2060 [2060]	РФ / Тувинский горный (37)	1971 г., длиннохвостый суслик <i>Spermophilus undulatus</i>
29	КМ 932 (И-3223) [894]	—«—	1987 г., блохи <i>Citellophilus tesquorum</i>
30	М-1944 (3)	—«—	2012 г., тарбаган <i>M. sibirica</i>
31	209	—«—	2015 г., длиннохвостый суслик <i>S. undulatus</i>
32	М-1951 [исх. И-1454- Алт.]	РФ / Горно-Алтайский высоко- горный (36)	2012 г., длиннохвостый суслик <i>S. undulatus</i>
33	45	—«—	2016 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
34	848	—«—	2017 г., длиннохвостый суслик <i>S. undulatus</i>
35	216	—«—	2017 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
36	276	—«—	2018 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
37	М-2033 (1097)	—«—	2019 г., длиннохвостый суслик <i>S. undulatus</i>
38	50	—«—	2020 г., алтайский сурок <i>M. baibacina</i>
39	EV линии НИИЭГ	—	1941 г., получен из Научно-ис- следовательского института эпидемиологии и гигиены (НИИЭГ)
40	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 68 (43/3)	—	1961 г., получен
41	<i>Escherichia coli</i> OP50	—	получен из «Caenorhabditis Ge- netics Center»

2.2 Анализ биохимических свойств штаммов *Y. pestis*

Определение денитрифицирующей и ферментативной активностей по отношению к глицерину и сахарам проводили в соответствии с практическим руководством «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013].

Определение денитрифицирующей способности. Одну петлю одно-двухсуточной культуры *Y. pestis* засеивали в 1 мл бульона LB (рН 7,2±0,1) с добавлением 0,1 % нитрата калия (KNO₃) и инкубировали при температуре 28 °С в течение 72 ч. По истечении времени в среду добавляли 0,5 мл реактива Грисса. Появление малинового окрашивания свидетельствовало о том, что исследуемый штамм обладает денитрифицирующей активностью.

Ферментация глицерина, рамнозы, мелибиозы, арабинозы. Одну петлю одно-двухсуточной культуры *Y. pestis* засеивали в жидких средах Гисса (1 % пептонная вода (рН 7,2), 1 % субстрат (углевод, глицерин), 1 % индикатор Андрее) и культивировали при 28 °С в течение 1–3 сут. Изменение цвета среды свидетельствовало о способности штамма возбудителя чумы ферментировать исследуемый субстрат.

Для более полной характеристики биохимических свойств штаммов *Y. pestis* использовали набор API 20 E (Bio-Mérieux, Франция), включающий 20 биохимических тестов и предназначенный для идентификации представителей семейства Enterobacteriaceae и других грамотрицательных палочек. Из суточной культуры возбудителя чумы готовили суспензию в физиологическом растворе в концентрации 5×10⁸ КОЕ/мл, которую затем вносили в лунки стрипа тест-системы согласно инструкции производителя. Набор инкубировали при 28 °С в течение 18–24 ч, после чего проводили учет результатов реакций по изменению окрашивания субстратов в лунках набора.

2.3 Определение чувствительности к бактериофагам Л-413С и Покровской

На поверхность чашек с твердой средой LB (рН 7,2) наносили 18–20 часовую культуру штамма *Y. pestis* и распределяли с помощью шпателя. На разные сегменты чашки Петри наносили по одной капле (0,02–0,03 мл) чумного Л-413С и чумного Покровской

бактериофагов. Чумной бактериофаг Покровской использовали с разведением до диагностического рабочего титра, указанного на упаковке препарата. После подсушивания посева культивировали при 28 °С в течение 15–18 ч. Появление на газоне «стерильных пятен» свидетельствует о лизисе культуры бактериофагами и принадлежности исследуемого штамма к виду *Y. pestis*.

2.4 Определение признака пигментсорбции

Из культуры штамма *Y. pestis*, выращенной при 28 °С в течение 24 ч, готовили микробную взвесь в физиологическом растворе в концентрации 5×10^3 КОЕ/мл. На твердую среду LB, содержащую 0,05 мг/мл Конго красного (рН 7,2), наносили 0,1 мл приготовленной взвеси и распределяли по поверхности шпателем. Инкубацию посевов проводили при 28 °С в течение 1–2 сут, после чего выдерживали при 4 °С в течение 2–3 сут. Штаммы, способные сорбировать на поверхности клеток пигмент из среды, формировали колонии темно-красного цвета. Штаммы, лишённые этой способности, формировали бесцветные колонии. В качестве отрицательного контрольного образца использовали штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013].

2.5 Определение питательных потребностей штаммов *Y. pestis*

Определение питательных потребностей штаммов *Y. pestis* проводили на минимальной синтетической среде, включающей 1,2 % минимальный агар (Difco) с добавлением: K_2HPO_4 – 25 мМ, $MgCl_2$ – 2,5 мМ, $FeCl_2$ – 0,1 мМ, $MnCl_2$ – 0,01 мМ, $CaCl_2$ – 2,5 мМ, $Na_2S_2O_3$ – 2,5 мМ, NH_4Cl – 10 мМ, D-глюкозы – 10 мМ, аминокислот в концентрации 0,5 мМ (фенилаланин, метионин, треонин, цистеин, лейцин, изолейцин, валин, аргинин, серин, тирозин, лизин, пролин, аланин, триптофан, гистидин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аденин, глицин). Анализ выполняли в соответствии с описанными методиками [Куклева и др., 2013; Brubaker, 1970]. Ауксотрофность по одной из аминокислот устанавливали по отсутствию роста исследуемого штамма на среде, в которой присутствовали необходимые компоненты, за исключением этой аминокислоты.

2.6 Определение зависимости роста от ионов кальция при температуре 37 °С

Из культуры штамма *Y. pestis*, выращенной при 28 °С в течение 24 ч, готовили микробную взвесь в физиологическом растворе в концентрации 5×10^3 КОЕ/мл. На твердую среду Хигучи-Смита (магниев-оксалатный агар) наносили 0,1 мл приготовленной суспензии и распределяли по поверхности с помощью шпателя. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 48 ч, после чего проводили учет колоний, для роста которых не требовалось наличие ионов кальция. Затем температуру культивирования штаммов понижали до 28 °С и через 24 ч учитывали количество выросших кальцийзависимых колоний. В качестве контрольного образца использовали штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013].

2.7 Определение плазмидного состава

Определение плазмидного состава проводили по методу С. Kado, S. Liu [Kado, Liu, 1981]. Полную петлю суточной культуры *Y. pestis* смешивали с 200 мкл свежеприготовленного лизирующего раствора (Tris – 50 мМ, 2,5 % SDS, 2N NaOH, pH 12,2–12,55) и инкубировали при 68 °С в течение 20 мин. После этого к образцам добавляли 12 мкл раствора NaOH и 200 мкл смеси фенол-хлороформа и перемешивали покачиванием. Затем образцы центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, отбирали, смешивали с 10 мкл красителя (бромфеноловый синий) и вносили в лунки 0,8 % агарозного геля. Электрофоретическое разделение плазмид проводили при 81 мА, 100 В, 50 Вт в течение 2 ч. По окончании электрофореза гель окрашивали 0,001 % раствором бромистого этидия в течение 2–5 мин и просматривали с использованием источника ультрафиолетового (УФ) излучения.

2.8 Получение компетентных клеток и трансформация штаммов *Y. pestis*

Подготовку компетентных клеток осуществляли согласно методике R. Conchas, E. Carniel [Conchas, Carniel, 1990]. Бактериальную культуру выращивали на агаре LB при 28 °С в течение 48 ч. Полную петлю культуры засеивали в бульон LB и культивировали при

28 °С в течение 12–24 ч при 250 об/мин до концентрации 1×10^{10} КОЕ/мл. Все манипуляции проводили на льду. Со дна пробирки собирали 1 мл выросшей культуры, осадок отделяли от супернатанта центрифугированием при 6000 об/мин в течение 2 мин. Образовавшийся осадок промывали 800 мкл деионизированной водой, аккуратно ресуспендировали и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 2 мин. Отмывку бактериальных клеток от среды повторяли 5 раз. После последней отмывки к осадку добавляли 200 мкл 10 % глицерина, осторожно гомогенизировали и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 1 мин. Осадок ресуспендировали в 50 мкл 10 % глицерина.

Процедуру трансформации клеток штаммов *Y. pestis* плазмидами pTurboGFP-B и pKatushka2S-B (Евроген, Россия) осуществляли в соответствии с инструкцией производителя методом электропорации в приборе Gene Pulser Xcell (BioRad, США). В кювету для электропорации переносили 50 мкл свежеприготовленных компетентных клеток в концентрации 1×10^{10} КОЕ/мл и 1 мкл раствора, содержащего ДНК векторной плазмиды в концентрации 500 нг/мкл. В электропораторе выбирали режим, оптимальный для трансформации клеток бактерий (*E. coli*): напряжение 2,5 кВ, фиксированная емкость 25 мкФ, сопротивление 200 Ом. Трансформированные клетки после электропорации переносили в питательную среду S.O.C. (Invitrogen, США) и культивировали при 28 °С в течение 1 часа при 250 об/мин. После этого клетки высевали на чашки Петри среды LB с 50 ед/мл ампициллина и инкубировали при 28 °С в течение 48 часов. Выросшие колонии просматривали с использованием источника ультрафиолетового излучения.

2.9 Определение вирулентности штаммов *Y. pestis in vivo*

Работу с животными проводили в соответствии с требованиями следующих нормативных документов: СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»; Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (Страсбург, 1986); Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [Безопасность работы с микроорганизмами ..., СП 3.3686-21; Европейская конвенция ..., 1986; Международные рекомендации ..., 1985]. Заражение беспородных белых мышей проводили подкожно взвесями *Y. pestis* в объеме 0,2 мл в концентрациях 1×10^3 КОЕ/мл и 1×10^4 КОЕ/мл. На

каждый вариант штамма и дозу брали по три мыши. Наблюдение и учет павших животных осуществляли на протяжении 8 дней с момента заражения. Павших животных вскрывали и оценивали патологоанатомическую картину. Для выделения чистой культуры осуществляли посев внутренних органов (легкие, печень, селезенка) на чашки Петри со средой LB, морфологию бактериальных клеток оценивали методом микроскопии отпечатков внутренних органов на предметных стеклах.

2.10 Выделение почвенных амёб

Выделение амёб проводили на твердой среде NGM следующего состава: 3 г NaCl, 17 г агара, 2,5 г пептона, 1 мл холестерина в этиловом спирте (5 мг/мл), 1 мл 1 М буфера KPO_4 pH 6,0 (35,6 г K_2HPO_4 , 108,3 г KH_2PO_4 , долить водой до 1 л), 1 мл 1 М MgSO_4 , 1 мл 1 М CaCl_2 , долить дистиллированной водой до литра. Для перевода содержащихся в образцах почвы простейших из физиологически неактивной стадии цист в стадию трофозоитов и последующего размножения почвенные вытяжки культивировали на плотной среде NGM с газоном штамма *E. coli* OP50 при 22 °C в течение 6 сут. Для получения культуры амёб, свободной от посторонней микрофлоры, под контролем лупы с чашек Петри микробиологической петлей отбирали не менее 200 клеток амёб в пробирки типа эппендорф, содержащих 1 мл раствора антибиотиков (по 20 ед/мл стрептомицина, гентамицина и ампициллина) в буфере АВ (1 г цитрат натрия, 0,98 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,355 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,34 г KH_2PO_4 , 0,02 г $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, долить водой до 1 л) и инкубировали в течение суток. По истечении срока для освобождения от антибиотических средств образцы центрифугировали при 4000 об/мин, осадок ресуспензировали в 1 мл буфере АВ и повторяли процедуру. Полученные суспензии хранили при температуре 4 °C. Для размножения культур амёб использовали жидкую питательную среду PYG (20 г пептон, 2 г дрожжевой экстракт, 18 г глюкоза, 1 г цитрат натрия, 0,98 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,355 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,34 г KH_2PO_4 , 0,02 г $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, долить водой до 1 л) с добавлением ампициллина в концентрации 50 ед/мл.

2.11 Выделение почвенных нематод

Выделение яйцекладущих нематод из почвенных образцов проводили на твердой среде NGM с газоном *E. coli* OP50. Навеску почвы (1–2 г) помещали на суточные газоны и инкубировали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 22 °С и относительной влажности воздуха 60 %. В течение 14–21 дней содержащиеся в почве нематоды размножались на бактериальном газоне и откладывали большое количество яиц. Получение аксенических культур нематод проводили методом последовательного пересева отдельных особей на новый газон *E. coli* OP50 или при отмывке яиц 4 % глутаральдегидом [Brenner, 1974].

С поверхности чашек Петри микробиологической петлей яйца нематод переносили в пробирки с буфером М9, после чего добавляли равный объем раствора 4 % глутаральдегида на том же буфере и инкубировали при температуре 4 °С в течение 4 ч. Отмыв биомассы от глутаральдегида проводили дважды в буфере М9 посредством центрифугирования при 2000 об/мин в течение 30 сек. В конце отмывки к осадку добавляли 100 мкл буфера М9, после чего суспензию наносили на чашки Петри с суточным газоном *E. coli* OP50. Через несколько дней инкубации при температуре 22 °С из яиц развивалось новое поколение нематод. Полученные культуры нематод хранили при 4 °С.

2.12 Выделение ДНК бактерий, амёб и нематод

Экстракцию ДНК штаммов *Y. pestis* осуществляли согласно требованиям МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Выделение бактериальной ДНК проводили с использованием набора АхуPrep (AXYGEN Biosciences, США) согласно инструкции производителя. Препараты ДНК, полученные в результате экстракции, использовали в ПЦР и для проведения полногеномного секвенирования. Выделение ДНК из образцов амёб и нематод осуществляли с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-Д» (АмплиСенс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

2.13 Полимеразная цепная реакция

В зависимости от длины нарабатываемого продукта использовали несколько комплектов реактивов. Для получения длинных фрагментов (более 800 п.н.) использовали набор БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для коротких фрагментов (до 800 п.н.) применяли наборы компаний Thermo Fisher Scientific (США), SibEnzyme (Россия). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Компоненты смеси включали: 2,5 мкл 10× ПЦР буфера для Taq ДНК-полимеразы, 1–1,2 мкл 25 мМ MgCl₂, 2,5 мкл раствора дНТФ (по 2 мМ каждого дезокси-нуклеозидтрифосфата), 0,2 мкл 5 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы. Реакционную смесь доводили до 15 мкл деионизованной водой. Затем в каждую пробирку вносили по 10 мкл ДНК штамма. В качестве отрицательного контроля в реакционную смесь вместо ДНК добавляли 10 мкл деионизованной воды, в качестве положительного контроля – 10 мкл ДНК контроля. Для каждой пары праймеров условия проведения ПЦР подбирались индивидуально. В обобщенном виде оптимизированные условия выглядят следующим образом: фаза денатурации ДНК (94–95 °С – 4–15 мин); денатурация (94–95 °С – 15–30 с); отжиг праймеров (54–57 °С – 15–60 с); элонгация (68–72 °С – 20–60 с); финальная элонгация (68–72 °С – 2–9 мин). Количество циклов амплификации варьировало в пределах от 20 до 40.

2.14 Секвенирование ДНК

Секвенирование проводили на базе лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Секвенирование полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* проводили в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку данных секвенирования и сборку генома *de novo* выполняли с использованием программ Ion Torrent Suite software package 5.12 и Newbler gsAssembler 2.6. Последовательности ридов собирали в геном, покрытие которого по геному референсного штамма CO92 (номер доступа в GenBank NC_003143.1) составило не менее 95 % с 60-кратным прочтением.

Определение нуклеотидных последовательностей участков генов рРНК бактерий, амёб и нематод, полученных в результате ПЦР, проводили на капиллярном секвенаторе ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, США).

2.15 Определение систематической принадлежности амёб, нематод, бактерий

Анализ полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей проводили при выравнивании последовательностей генов организмов, депонированных в международной базе данных NCBI GenBank программой NCBI BLAST алгоритмом megablast [Johnson et al., 2008]. Систематическую принадлежность выделенных штаммов амёб, нематод и бактерий по полученным последовательностям генов устанавливали на основании процента гомологии с имеющимися в открытом доступе последовательностями организмов в базе данных GenBank NCBI. Принадлежность к одному роду устанавливали при гомологии последовательностей не менее 90 % и покрытии 100 %, к одному виду – не менее 99 % гомологии последовательностей и покрытии 100 %.

2.16 Филогенетический анализ амёб, почвенных и энтомопаразитических нематод

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA 7.0 и MEGA 11 [Kumar et al., 2016] и алгоритмом mafft [URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> (дата обращения 26.02.2024)]. Филогенетическую реконструкцию проводили с помощью программ MEGA 7.0 и Mega 11 с использованием метода Maximum Likelihood и эволюционной модели Tamura-Nei [Tamura, Nei, 1993]. Определение статистической достоверности топологии филогенетических деревьев и их ветвей осуществлялось методом бутстреп-анализа с количеством итераций, равном 500 [Felsenstein, 1985]. При проведении филогенетического анализа использовались нуклеотидные последовательности штаммов из базы данных GenBank NCBI. Выборки штаммов, использованных в данном исследовании для анализа генов рРНК, представлены в таблицах 2.2–2.5.

Таблица 2.2 – Нуклеотидные последовательности гена 18S амёб *Acanthamoeba* spp., использованные в работе

№	Вид	Изолят	Номер доступа
1	2	3	4
1	<i>A. astronyxis</i>	Ray & Hayes ATCC 30137	AF019064
2	<i>A. polyphaga</i>	CCAP 1501/3b ATCC 30872	AY026244
3	<i>A. sp.</i>	OB3b_3A	AB425945
4	<i>A. polyphaga</i>	OX-1 CCAP 1501/3c	AF019051
5	<i>A. tubiashi</i>	OC-15C ATCC 30867	AF019065
6	<i>A. comandoni</i>	ATCC 30135	AF019066
7	<i>A. culbertsoni</i>	Lilly A1 ATCC 30171	AF019067
8	<i>A. healyi</i>	ATCC 30866	AF019070
9	<i>A. lenticulata</i>	Jc-1	U94739
10	<i>A. palestinensis</i>	2802 ATCC 50708	AF019063
11	<i>A. polyphaga</i>	Page-23 ATCC 30871	AF019061
12	<i>A. triangularis</i>	SH621 ATCC 50254	AF346662
13	<i>A. palestinensis</i>	Reich ATCC 30870	U07411
14	<i>A. griffini</i>	S-7 ATCC 30731	U07412
15	<i>A. castellanii</i>	Neff ATCC 30010	U07416
16	<i>A. castellanii</i>	ATCC 30011	U07413
17	<i>A. castellanii</i>	Ma ATCC 50370	U07414
18	<i>A. sp.</i>	Fernandez ATCC 50369	U07409
19	<i>A. rhyodes</i>	Singh ATCC 30973	AY351644
20	<i>A. sp.</i>	UWC-9 ATCC PRA-3	AF132134
21	<i>A. sp.</i>	PN13	AF333609
22	<i>A. jacobsi</i>	AcaP13_cl2	KY513791
23	<i>A. sp.</i>	U/H-C1	AY026245
24	<i>A. sp.</i>	Ac-E1a	GU808277
25	<i>A. tubiashi</i>	CDC, V621	KC822461
26	<i>A. sp.</i>	USP-AWW-A68	KJ413084
27	<i>A. sp.</i>	OSU 04-020	DQ451161
28	<i>A. pyriformis</i>	CR15	KX840327
29	<i>A. royreba</i>	ATCC30884	CDEZ01000000
30	<i>A. castellanii</i>	V006 ATCC 50494	U07400
31	<i>A. hatchetti</i>	BH-2 ATCC 30730	AF019068

Продолжение Таблицы 2.2

1	2	3	4
32	<i>A. sp.</i>	AcW61	MZ272149

Таблица 2.3 – Нуклеотидные последовательности рибосомальных генов (часть гена 17S, спейсер ITS1, ген 5.8S, спейсер ITS2, часть гена 26S) диктиостеллид, использованные в работе

№	Вид	Изолят	Номер доступа
1	2	3	4
1	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	118B	AM282604.1
2	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	89G	AM282604.1
3	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	14A	AM282600.1
4	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	20B	AM282601.1
5	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	G81	HQ141467.1
6	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	–	AF351197.1
7	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	GR11	HQ141477.1
8	<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i>	88A	AM282602.1
9	<i>Dictyostelium rosarium</i>	M45	AM168065.1
10	<i>Dictyostelium macrocephalum</i>	B33	AM168049.1
11	<i>Dictyostelium clavatum</i>	Tns-C-189	AM168034.1
12	<i>Dictyostelium intermedium</i>	PJ11	AM168044.1
13	<i>Dictyostelium brunneum</i>	WS589	AM168031.1
14	<i>Dictyostelium giganteum</i>	WS589	AM168042.1
15	<i>Dictyostelium septentrionalis</i>	AK2	AM168067.1
16	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	var. stoloniferum FOII-1	AM168055.1
17	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	89C	AM282596.1
18	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	115A	AM282597.1
19	<i>Dictyostelium capitatum</i>	91HO-50	AM168032.1
20	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	AR4B	AM282599.1
21	<i>Dictyostelium pseudobrefeldianum</i>	91HO-8	AM168059.1
22	<i>Dictyostelium brefeldianum</i>	G121	HQ141450.1
23	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	S28b	HQ141468.1
24	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	1C	AM282595.1
25	<i>Dictyostelium mucoroides</i>	1333B	AM282598.1

Продолжение Таблицы 2.3

1	2	3	4
26	<i>Dictyostelium citrinum</i>	OH494	AM168033.1
27	<i>Dictyostelium discoideum</i>	CF3B	JF930875.1
28	<i>Dictyostelium purpureum</i>	WS321	HQ141472.1
29	<i>Dictyostelium firmibasis</i>	WS-14	LC159264.1
30	<i>Polyspondylium violaceum</i>	–	HQ732199.1

Таблица 2.4 – Нуклеотидные последовательности участка гена 18S рРНК свободноживущих нематод, использованные в работе

№	Вид	Изолят	Номер доступа GenBank
1	2	3	4
1	<i>Panagrolaimus detritophagus</i>	voucher Ugentwbert-29	GU014546.1
2	<i>Panagrolaimus davidi</i>	–	AJ567385.1
3	<i>Panagrolaimus artyukhovskii</i>	LKC44	MK636578.1
4	<i>Panagrolaimus facetus</i>	RCGT20148	KY119819.1
5	<i>Panagrolaimus subelongatus</i>	spTreatment_8	KY119732.1
6	<i>Panagrolaimus sp.</i>	4164	MK301117.1
7	<i>Panagrolaimus sp.</i>	AHB-2020	MW412913.1
8	<i>Panagrolaimus sp.</i>	Rigidus1	MK547102.1
9	<i>Halicephalobus gingivalis</i>	–	AF202156.1
10	<i>Halicephalobus sp.</i>	10B	MK087051.1
11	<i>Halicephalobus gingivalis</i>	46B946C9	JX674039.1
12	<i>Turbatrix aceti</i>	–	KU180673.1
13	<i>Turbatrix aceti</i>	–	AF202165.2
14	<i>Plectonchus wyganti</i>	PIChWyg1	KJ636307.1
15	<i>Plectonchus sp.</i>	JH-2004	AY593920.1
16	<i>Plectonchus sp.</i>	PDL0025	AF202154.1
17	<i>Panagrobelus stammeri</i>	PGBeSta1	FJ969134.1
18	<i>Panagrobelus sp.</i>	GS_b4	LC382055.1
19	<i>Panagrobelus stammeri</i>	–	AF202153.2
20	<i>Panagrellus sp.</i>	2 GVDU-2019	MN082327.1

Продолжение Таблицы 2.4

1	2	3	4
21	<i>Panagrellus redivivus</i>	–	AF036599.1
22	<i>Strongyloides stercoralis</i>	–	M84229.1
23	<i>Fictor sp.</i>	1 VS-2014 RS9001	KJ877233.1
24	<i>Fictor sp.</i>	2 VS-2014 RS9002	KJ877234.1
25	<i>Sudhausia aristotokia</i>	RS9011	KJ877231.1
26	<i>Sudhausia crassa</i>	RS9012	KJ877232.1
27	<i>Sudhausia floridensis</i>	NKZ361	LC214841.1
28	<i>Micoletzkyia palliati</i>	–	JX163974.1
29	<i>Diplogasteroides asiaticus</i>	–	LC027672.1
30	<i>Diplogasteroides luxuriosae</i>	NKZ304	LC099973.1
31	<i>Diplogasteroides magnus</i>	RS1983	KJ877214.1
32	<i>Neodiplogaster unguispiculata</i>	DS124	MH048997.1
33	<i>Tylopharynx foetidus</i>	wb3	EU306343.1
34	<i>Diplogasteriana schneideri</i>	RS5440	KJ877203.1
35	<i>Acrostichus floridensis</i>	NKZ366	LC374587.1
36	<i>Diplogastrellus gracilis</i>	SB306	KJ877216.1
37	<i>Pseudodiplogasteroides sp.</i>	VS-2014 SB257	KJ877217.1
38	<i>Oigolaimella attenuata</i>	SB353	KJ877219.1
39	<i>Rhabditolaimus leuckarti</i>	RS5525	JQ005865.1
40	<i>Koerneria hylobii</i>	RS5529	KJ877224.1
41	<i>Koerneria sp.</i>	RS1982	JX163979.1
42	<i>Diplogasteroides sp.</i>	Fuchsnema VS-2014 RS5537	KJ877228.1
43	<i>Diplogasteroides halleri</i>	RS5531	KJ877227.1
44	<i>Fictor platypapillata</i>	SERB/M9/Vessu	OP473973.1
45	<i>Rhabditidoides humicolus</i>	RGD243	LC095813.1
46	<i>Poikilolaimus regenfussi</i>	SB199	AF083022.1
47	<i>Poikilolaimus oxircercus</i>	788	FJ040436.1

Таблица 2.5 – Нуклеотидные последовательности рибосомальных генов (часть гена 18S, спейсер ITS1, ген 5.8S, спейсер ITS2, часть гена 28S) энтомопаразитических нематод, использованные в работе

№	Вид	Изолят	Номер доступа
1	2	3	4
1	<i>Rubzovinema sp.</i>	EIK-2013	KF155281.1
2	<i>Rubzovinema sp.</i>	EIK-2013	KF155282.1
3	<i>Rubzovinema sp.</i>	EIK-2013	KF155283.1
4	<i>Deladenus siricidicola</i>	Qingdao	MW487900.1
5	<i>Deladenus posteroporus</i>	8714	KY098774.1
6	<i>Iotonchium ungulatum</i>	Iung2-Nara	LC625870.1
7	<i>Anguina tritici</i>	–	ON146309.1
8	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Pla2	GQ469496.1
9	<i>Ditylenchus gigas</i>	–	LR536599.1
10	<i>Ditylenchus weischeri</i>	751_CT-(C11F19-SK)	MG386879.1
11	<i>Subanguina radicicola</i>	XQHOO_00202	JN885538.1
12	<i>Litylenchus coprosmate</i>	–	GU727548.1
13	<i>Subanguina moxae</i>	XQHOO 0010	JN865234.1
14	<i>Ditylenchus destructor</i>	Imawa25	MT492484.1
15	<i>Neoditylenchus sp.</i>	NK-2021 Xo	LC631546.1
16	<i>Sychnotylenchus sp.</i>	NK-2021 Ht	LC631545.1
17	<i>Sphaerulariamvespae</i>	–	AB300595.1
18	<i>Pratylenchus scribneri</i>	XC-382-1	MT586763.1
19	<i>Pratylenchus vulnus</i>	APv	KY424235.1
20	<i>Pratylenchus penetrans</i>	–	FJ799117.1
21	<i>Zygotylenchus gansuensis</i>	A22Z12	KJ129772.1
22	<i>Nacobbus aberrans</i>	N5	DQ318714.1
23	<i>Belonolaimus longicaudatus</i>	BLGr17	DQ672380.1
24	<i>Trophurus wuhuensis</i>	WHI-5	MF139732.1
25	<i>Pratylenchus neglectus</i>	016B	MG205580.1
26	<i>Hoplolaimus columbus</i>	–	DQ309584.1
27	<i>Hoplolaimus seinhorsti</i>	FJJY01	KX446971.1

Продолжение Таблицы 2.5

1	2	3	4
28	<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	ZZHM 0908	KF443216.1
29	<i>Helicotylenchus crenacauda</i>	—	DQ309586.1
30	<i>Howardula sp.</i>	SP-F	AF519222.1
31	<i>Howardula sp.</i>	SP-B	AF519223.1
32	<i>Howardula neocosmis</i>	—	AF519226.1
33	<i>Howardula aoronymphium</i>	E334	AF519224.1
34	<i>Howardula sp.</i>	SP-PS	AF519231.1
35	<i>Howardula sp.</i>	SP-MA	AF519233.1
36	<i>Howardula sp.</i>	SP-A	AF519232.1
37	<i>Litylenchus crenatae</i>	mccannii 104H81	MK292137.1

2.17 Филогенетический анализ возбудителя чумы

Для выявления коровых SNPs в геномах *Y. pestis* использовали программу Wombac 2.0 [URL: <https://github.com/tseemann/wombac> (дата обращения 26.02.2023)]. Из полученного массива данных удаляли участки гомоплазии [Cui et al., 2013] и на основе выявленных коровых SNPs строили дендрограмму с помощью программы SeaView 5.0.5 алгоритмом Maximum Likelihood (модель HKY85) с 1000 бутстреп-репликами. Визуализацию графов филогенетического дерева проводили в программе FigTree 1.4.3 [URL: <http://influenza.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (дата обращения 23.04.2022)]. В филогенетическом анализе были использованы полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis*, депонированные в международной базе данных NCBI GenBank (Таблица 2.6).

Таблица 2.6 – Номера доступа и филогенетическая принадлежность использованных штаммов *Y. pestis*, депонированных в базе данных NCBI GenBank

№	Штамм <i>Y. pestis</i>	Филогенетическая ветвь	Номер доступа
1	2	3	4
1	620024	0.PE7	GCA_000323485.1
2	Pestoides F	0.PE2	GCA_000016445.1
3	Pestoides A	0.PE4a	GCA_000182545.1

Продолжение Таблицы 2.6

1	2	3	4
4	I-2422	0.PE5	GCA_003122795.1
5	164	0.ANT1	GCA_000323185.1
6	42013	0.ANT1	GCA_000323365.1
7	CMCC49003	0.ANT1	GCA_000324225.1
8	945	0.ANT1	GCA_000323665.1
9	CMCC8211	0.ANT1	GCA_000324345.1
10	42095	0.ANT1	GCA_000323425.1
11	CMCC42007	0.ANT1	GCA_000324185.1
12	CMCC43032	0.ANT1	GCA_000324205.1
13	B42003004	0.ANT2	GCA_000169675.1
14	2330	0.ANT2	GCA_000320465.1
15	231	0.ANT3	GCA_000734805.1
16	CMCC38001	0.ANT3	GCA_000324165.1
17	A1956001	0.ANT3	GCA_000323705.1
18	42082	0.ANT3	GCA_000323385.1
19	CMCC21106	0.ANT3	GCA_000324065.1
20	42091	0.ANT3	GCA_000323405.1
21	A-1836	0.ANT5	GCA_002412255.1
22	Nairobi	1.ANT	GCA_000835005.1
23	Antiqua	1.ANT	GCA_000013825.1
24	UG05-0454	1.ANT	GCA_000169615.1
25	CO92	1.ORI1	GCA_000009065.1 хромосома – NC_003143.1
26	34008	2.ANT1	GCA_000323305.1
27	34202	2.ANT1	GCA_000323325.1
28	Nepal516	2.ANT1	GCA_000013805.1
29	2	2.ANT2	GCA_000320445.1
30	351001	2.ANT2	GCA_000323345.1
31	CMCC347001	2.ANT2	GCA_000324125.1
32	G1996006	2.ANT2	GCA_000324885.1
33	G1996010	2.ANT2	GCA_000324905.1
34	CMCC348002	2.ANT2	GCA_000324145.1
35	I-1996	2.ANT3	GCA_001601285.1

Продолжение Таблицы 2.6

1	2	3	4
36	CMCC92010	2.ANT3	GCA_000324505.1
37	CMCC95001	2.ANT3	GCA_000324545.1
38	CMCC96001	2.ANT3	GCA_000324565.1
39	CMCC96007	2.ANT3	GCA_000324585.1
40	CMCC67001	2.ANT3	GCA_000324305.1
41	CMCC104003	2.ANT3	GCA_000323905.1
42	CMCC51020	2.ANT3	GCA_000324245.1
43	CMCC106002	2.ANT3	GCA_000323925.1
44	CMCC64001	2.ANT3	GCA_000324265.1
45	H1959004	2.ANT3	GCA_000324965.1
46	5761	2.ANT3	GCA_000323465.1
47	735	2.ANT3	GCA_000323585.1
48	KIM10	2.MED1	GCA_000006645.1
49	C1976001	3.ANT1	GCA_000323765.1
50	7	3.ANT1	GCA_010974835.1
51	CMCC71001	3.ANT1	GCA_000324325.1
52	C1976001	3.ANT1	GCA_000323765.1
53	71021	3.ANT1	GCA_000323525.1
54	MGJZ6	3.ANT2	GCA_000325265.1
55	MGJZ7	3.ANT2	GCA_000325285.1
56	MGJZ9	3.ANT2	GCA_000325305.1
57	MGJZ11	3.ANT2	GCA_000325205.1
58	MGJZ3	3.ANT2	GCA_000325245.1
59	MGJZ12	4.ANT	GCA_000325225.1

2.18 Статистический анализ

Эксперименты по определению биохимических свойств штаммов, питательных потребностей, совместному культивированию *Y. pestis* с амебами, анализу выживаемости нематод выполняли не менее, чем в трех повторах.

При определении динамики изменения концентрации *Y. pestis* при совместном культивировании с амебами для каждого экспериментального образца (на основе трех измерений) на протяжении всего эксперимента были рассчитаны 95-процентные доверительные интервалы для уровня значимости $\alpha=0,05$.

Анализ выживаемости нематод при культивировании на газонах с *Y. pestis* проводили с помощью программы PRISM (версия 9.5.0). Для расчета выживаемости использовали метод Каплана-Мейера, сравнение кривых выживаемости осуществляли с помощью логарифмического рангового критерия (Мантела-Кокса). Экспериментальный образец считали значимо отличающимся от контрольного при p -уровне значимости менее 0,05.

ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ ШТАММОВ *Y. pestis* АНТИЧНОГО БИОВАРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT, КОНСТРУИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ШТАММОВ

В настоящий момент Горно-Алтайский высокогорный очаг является одним из наиболее эпизоотически активных очагов Российской Федерации [Попов и др., 2024]. Эпизоотическая активность очага впервые выявлена в очаге в 1961 г. и с тех пор является постоянной. С 2012 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге, помимо распространенных ранее на этой территории штаммов алтайского биовара центральноазиатского подвида (0.PE4a), выделяются высоковирулентные штаммы основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT [Балахонов и др., 2013]. Штаммы 4.ANT также распространены в трансграничном Сайлюгемском и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан природных очагах чумы в Монголии и в Тувинском горном очаге в России. В период с 2014 по 2016 гг. на территории Республики Алтай ежегодно регистрировали по одному случаю заболевания чумой человека [Кутырев и др., 2014; Балахонов и др., 2016]. Наличие активного эпизоотического процесса, выделение эпидемически значимых штаммов *Y. pestis* и доступность образцов почвенного биоценоза нор грызунов из Горно-Алтайского высокогорного очага позволяют провести приближенное к природным условиям экспериментальное моделирование взаимодействия возбудителя чумы с членами паразитарной системы Горно-Алтайского очага для выявления особенностей экологии возбудителя как в этом эндемичном регионе, так и закономерностей персистенции возбудителя чумы в других природных очагах чумы. Выделение культур из мест с выявленной в настоящее время эпизоотической активностью Горно-Алтайского высокогорного очага предоставляет возможность использования в экспериментах актуальных на данный момент штаммов возбудителя чумы и культур почвенных организмов, адаптированных к обитанию в одном биоценозе. Получение сведений о фенотипических свойствах современных штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT, в том числе потребности в факторах роста, необходимо для подбора оптимальных экспериментальных условий при моделировании взаимодействий организмов.

3.1 Фенотипические и генетические особенности штаммов *Y. pestis* из Горно-Алтайского высокогорного очага в сравнении со штаммами античного биовара из других природных очагов чумы

В связи с эпизоотической активностью в природных очагах чумы Горного Алтая и Тувы особую актуальность приобретает изучение фенотипических и генетических особенностей штаммов *Y. pestis*, выделенных на этих территориях. Для установления фенотипических и генетических особенностей и отличий в экологии штаммов филогенетической линии 4.ANT необходимо провести их сравнение со штаммами других филогенетических линий античного биовара. Для этого нами исследованы свойства штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических линий, выделенных на территориях различных природных очагов мира. Данные об использованных штаммах представлены в Главе 2 Материалы и методы (Таблица 2.1).

Изучение биохимических свойств штаммов *Y. pestis* античного биовара. Штаммы *Y. pestis* различных подвигов и биоваров отличаются по ряду биохимических свойств. Основными биохимическими особенностями штаммов, относящихся к античному биовару основного подвида *Y. pestis*, является наличие ферментации арабинозы и глицерина и редукции нитратов при отсутствии ферментации рамнозы и мелибиозы. Установлено, что причиной неспособности штаммов *Y. pestis* основного подвида ферментировать мелибиозу является внедрение мобильного элемента IS285 в ген галактозидпермеазы *melB* [Ерошенко и др., 2011; Charusanti et al., 2011], в то время как неспособность к утилизации рамнозы в качестве единственного углеродного субстрата предположительно заключается в точечной мутации в гене транскрипционного активатора RhaS [Куклева и др., 2008]. Ферментация глицерина характерна для штаммов античного и средневекового биоваров основного подвида, тогда как штаммы восточного биовара утратили это свойство в результате делеции размером 93 п.н. в гене *glpD* (*YPO3937*), кодирующем аэробную глицерол-3-фосфатдегидрогеназу [Motin et al., 2002].

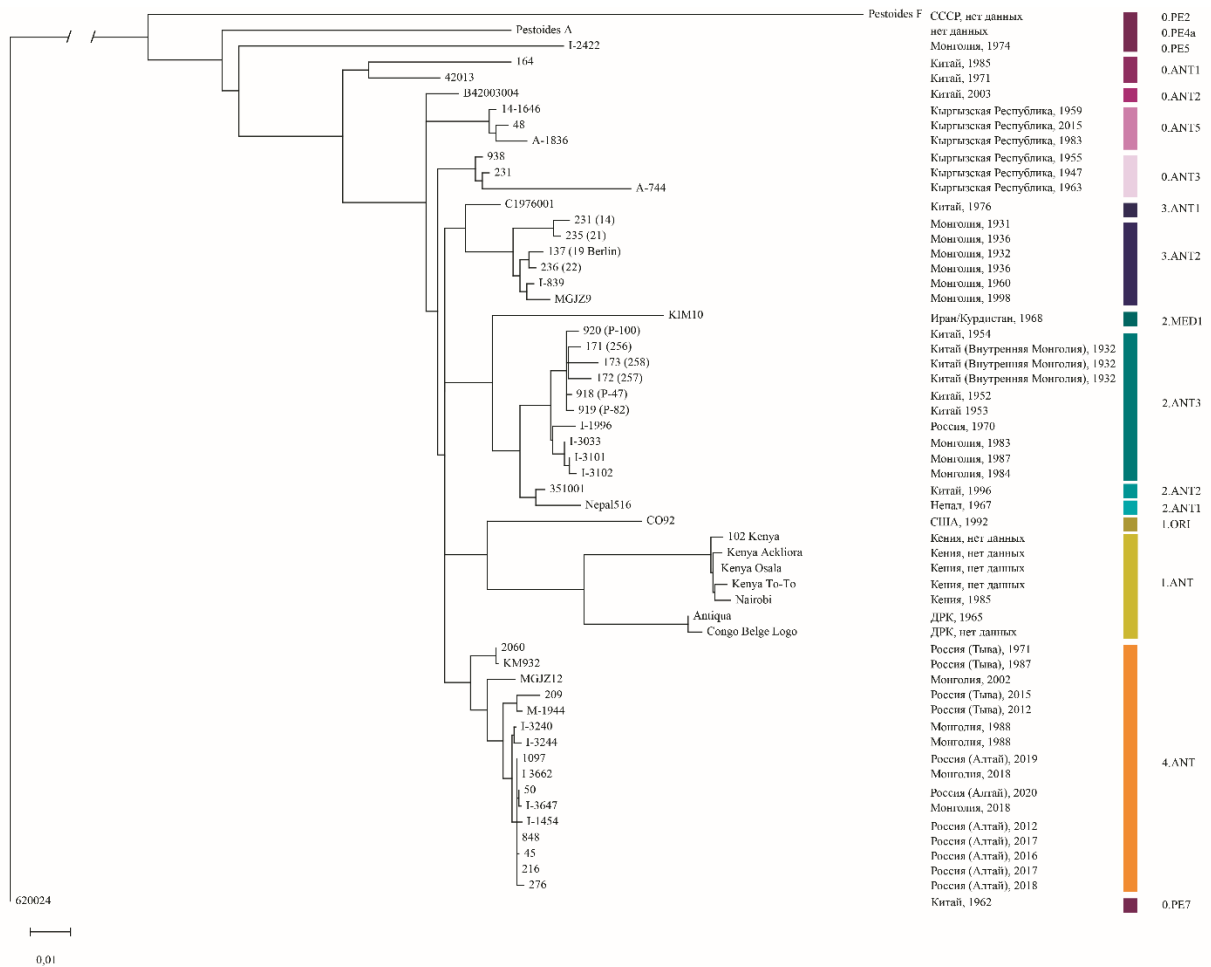
При исследовании биохимической активности взятых в исследование 38 штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических линий, выделенных на территориях Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы Российской Федерации, в Монголии, Китайской Народной Республике, Кыргызской Республике, Кении и Демократической Республике Конго, выявлены характерные для штаммов этого биовара

основного подвида отношения к моно-дисахаридам и глицерину, а именно способности к ферментации арабинозы и глицерина при отсутствии ферментации рамнозы и мелибиозы. Наличие денитрифицирующей активности у исследованных штаммов также подтверждает их принадлежность к античному биовару. Исключение составил штамм *Y. pestis* 235 (21), выделенный в 1936 г. в аймаке Завхан Монголии, не редуцирующий нитраты, но по наличию замены единичного нуклеотида (SNP) в гене *YPO3183* однозначно относимый к группе 3.ANT2 античного биовара [Ерошенко и др., 2014; Куклева и др., 2015]. Проведенный анализ мутаций, связываемых с отсутствием денитрификации у штаммов средневекового биовара основного подвида (замена нуклеотида G→T в позиции 613 в гене *narA*) и биовара микротус центральноазиатского подвида (замена G→A, 1021 в гене *narA*) [Deng et al., 2002; Zhou et al., 2004] не выявил этих мутаций у штамма *Y. pestis* 235 (21) и, следовательно, причина отсутствия денитрификации у этого штамма античного биовара вызвана другими причинами, которые предстоит выяснить в дальнейшем.

Кроме основных биохимических особенностей для всех 38 исследованных штаммов античного биовара возбудителя чумы была показана активность β-галактозидазы (ортонитрофенил-βD-галактопиранозидаза), а у штамма *Y. pestis* 236 (22) выявлена способность к окислению амигдалина.

Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* античного биовара. Для определения филогенетической принадлежности взятых в исследование штаммов в популяционной структуре античного биовара был проведен филогенетический анализ их полногеномных последовательностей. Всего для проведения анализа использовано 57 штаммов *Y. pestis* различных филогенетических линий из разных очагов мира, из которых 15 последовательностей взято из базы данных NCBI GenBank, остальные 42 штамма секвенированы во ФКУН Российский противочумный институт «Микроб».

На основании выявленных 1756 коровых SNPs построена дендрограмма, представленная на рисунке 3.1.



Выполнен с помощью программ Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 (алгоритм Maximum Likelihood, модель HKY85, 1000 бутстреп-реплик)

Рисунок 3.1 – Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* античного биовара на основе 1756 коровых SNPs 57 штаммов из природных очагов мира

Филогенетическое дерево, полученное в ходе SNP-анализа геномов штаммов возбудителя чумы, демонстрирует популяционную структуру штаммов античного биовара и позволяет определить филогенетическую принадлежность исследованных в настоящей работе штаммов. В основании дендрограммы располагаются штаммы линии 0, к которым относятся штаммы *Y. pestis* неосновных подвидов (0.PE7 – тибетский, 0.PE2 – кавказский, 0.PE4a – центральноазиатский (алтайский биовар), 0.PE5 – улегейский) и штаммы основного подвида античного биовара филогенетической линии 0.ANT из очагов Кыргызстана и Китая. Используемые штаммы линии 0.ANT были выделены на территории Кыргызской Республики в Аксайском высокогорном очаге чумы в середине прошлого столетия и в Верхненарынском высокогорном очаге в 2015 г. Они образуют две отдельные филогенетические ветви – 0.ANT3, распространенную также в Китае, и 0.ANT5, уникальную для

территории Кыргызстана, отходящие от древнего ствола эволюции. Помимо исследованных штаммов к группе штаммов линии 0 относят филогенетические ветви 0.ANT1 и 0.ANT2, уникальные для территории Китая.

Штаммы линии 1.ANT характерны для Центральной и Восточной Африки (ДРК, Кения, Уганда, Замбия) [Heisch et al., 1953; Morelli et al., 2010; Respcio-Kingry et al., 2016; Nyirenda et al, 2016; Nyirenda et al., 2017]. G. Morelli с соавторами в этой группе штаммов выделили три филогенетические ветви: 1.ANT1, к которой относятся штаммы из ДРК и Уганды, а также 1.ANT2 и 1.ANT3, распространенные в ДРК и Кении [Morelli et al., 2010]. В нашем исследовании штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 1.ANT делятся на два отдельных подкластера. Штамм *Y. pestis* Congo Logo кластеризуется со штаммом *Y. pestis* Antiqua филогенетической ветви 1.ANT1, выделенным на территории ДРК в 1965 г. Штаммы из Кении образуют общий кластер со штаммом *Y. pestis* Nairobi, также выделенным в этой стране в 1985 г., однако принадлежность этих штаммов к конкретным филогенетическим ветвям внутри линии 1.ANT неизвестна.

Ареал штаммов филогенетической линии 2.ANT расположен в Центральной Азии, а именно в Непале, Китае, Монголии и сопредельных с ними территориях Российской Федерации (Забайкальский степной очаг чумы) [Куклева и др., 2013; Куклева и др., 2015; Cui et al., 2013]. В нашем исследовании использованы 3 штамма линии 2.ANT, выделенные на территории Маньчжурии (сейчас Внутренняя Монголия, Китай) в 1928 г., 3 штамма из Китая 1952–1954 гг. и 3 штамма из аймака Хэнтий в Монголии, выделенные в 90-х годах прошлого столетия. По результатам филогенетического анализа все эти штаммы относятся к филогенетической ветви 2.ANT3, однако внутри этой группы штаммов располагаются два обособленных кластера. Первый кластер представлен штаммами *Y. pestis* из Китая, ко второму относятся штаммы возбудителя чумы из Монголии и России. При этом, штамм *Y. pestis* И-1996 из Забайкальского степного очага достаточно сильно отличается от монгольских штаммов.

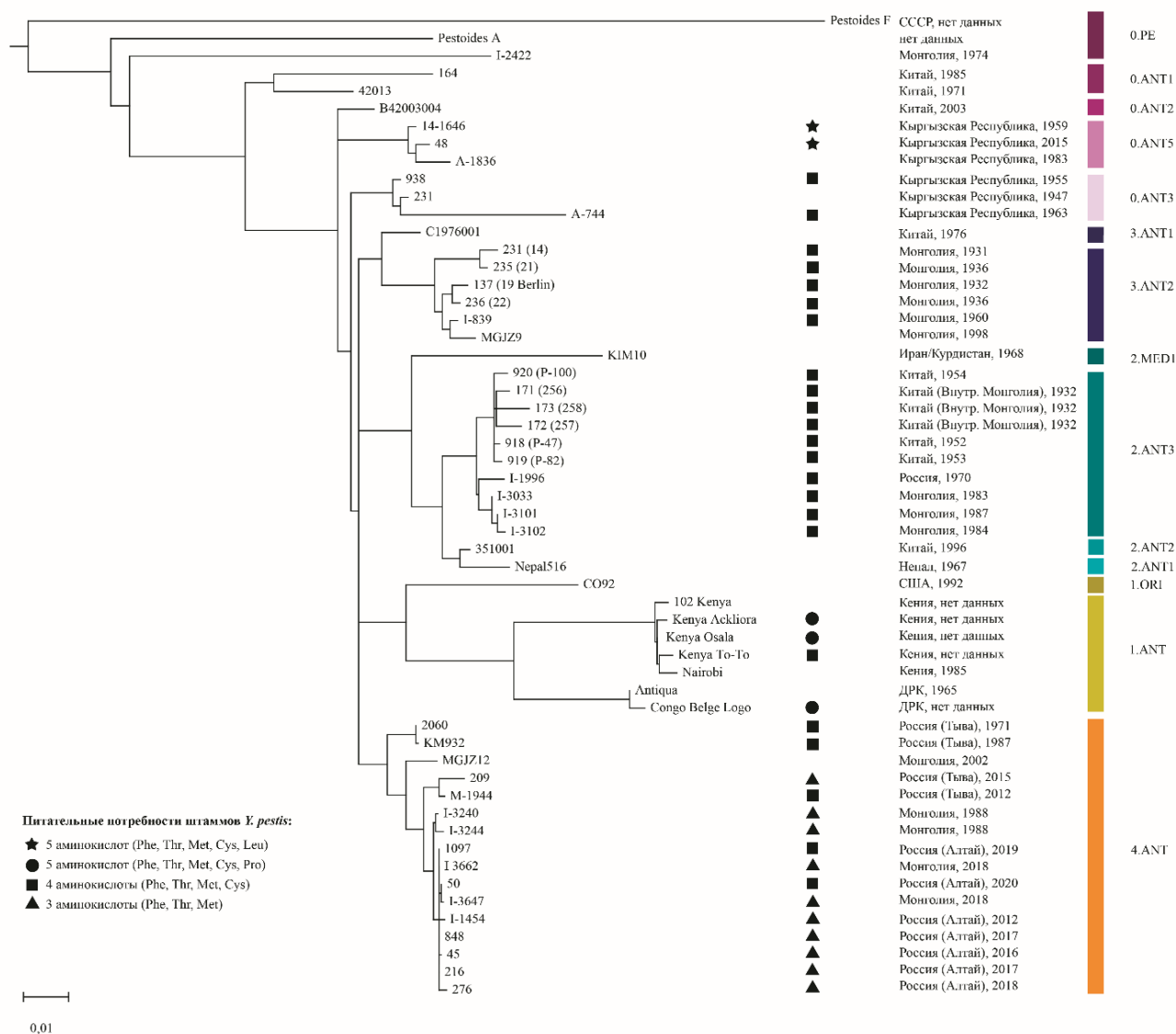
Штаммы филогенетической линии 3.ANT распространены на территории Монголии и Китая: для Китая характерно присутствие штаммов филогенетической ветви 3.ANT1; для Монголии – штаммов 3.ANT2 [Куклева и др., 2015; Cui et al., 2013]. Для анализа были взяты 5 штаммов, выделенных на территории Монголии в период 1931–1960 гг. из разных аймаков (Хэнтий, Увс, Завхан). В результате анализа филогенетических связей установлена их принадлежность к ветви 3.ANT2. При рассмотрении популяционной

структуры этой группы видно, что клинические штаммы 231 (14) и 235 (21) кластеризуются вместе, несмотря на разное место и время выделения (аймак Хэнтий, 1931 г. и аймак Завхан, 1936 г. соответственно).

Штаммы филогенетической линии 4.ANT распространены на территориях природных очагов чумы РФ (Республик Тыва и Алтай) и Монголии. Исследовано 15 штаммов *Y. pestis* античного биовара филогенетической линии 4.ANT, выделенных здесь в 1971–2020 гг. В соответствии со своей принадлежностью к филогенетической линии 4.ANT штаммы формируют один общий кластер. При более подробном рассмотрении популяционной структуры этой филогенетической группы отмечается последовательная кластеризация групп штаммов в зависимости от времени и места выделения. Так, отдельный наиболее эволюционно ранний кластер 4.ANT образован штаммами *Y. pestis* 2060 и *Y. pestis* KM932, выделенными на территории Тувинского горного очага чумы в 1971 и 1987 г. соответственно. Далее последовательно расположены штамм *Y. pestis* MGJZ12 из Монголии 2002 г. выделения, отдельный кластер современных штаммов из Тывы и кластер штаммов *Y. pestis* из Монголии 1988 г. выделения. Еще один кластер представлен современными штаммами из Алтая (2012–2020 гг.) и Монголии (2018 г.).

Изучение питательных потребностей штаммов *Y. pestis* античного биовара. Следующим шагом исследования было проведение сравнительного анализа питательных потребностей штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических линий. Для определения питательных потребностей штаммов *Y. pestis* их высевали на чашки Петри с агаром Difco с добавлением определенного набора аминокислот (Материалы и методы 2.1.7). Вначале для всех штаммов подбирался минимальный набор аминокислот, обеспечивающий рост бактериальных колоний, затем методом исключения одной аминокислоты из состава питательной среды по отсутствию роста делали заключение об ауксотрофности штаммов по этой аминокислоте.

По результатам проведенного исследования все штаммы *Y. pestis* античного биовара являются ауксотрофами по трем аминокислотам (фенилаланин, метионин, треонин), как и штаммы других биоваров *Y. pestis* основного подвида [Куклева и др., 2013]. Помимо общих питательных потребностей штаммы античного биовара разных филогенетических групп имеют дополнительные питательные потребности, которые можно разделить на четыре группы (Рисунок 3.2, Таблица 3.1).



Условные обозначения присвоены штаммам, для которых в настоящем исследовании были изучены питательные потребности

Рисунок 3.2 – Питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара в зависимости от филогенетической принадлежности

Таблица 3.1 – Отличия различных штаммов *Y. pestis* античного биовара в зависимости роста от состава аминокислот

№ группы	Питательные потребности	Филогенетические ветви штаммов <i>Y. pestis</i>
1	фенилаланин, метионин, треонин, цистеин, лейцин	0.ANT5
2	фенилаланин, метионин, треонин, цистеин, пролин	1.ANT
3	фенилаланин, метионин, треонин, цистеин	0.ANT3 1.ANT (<i>Y. pestis</i> Kenya To-To) 2.ANT3 3.ANT2 4.ANT (Тыва и Алтай)
4	фенилаланин, метионин, треонин	4.ANT (Монголия, Тыва и Алтай)

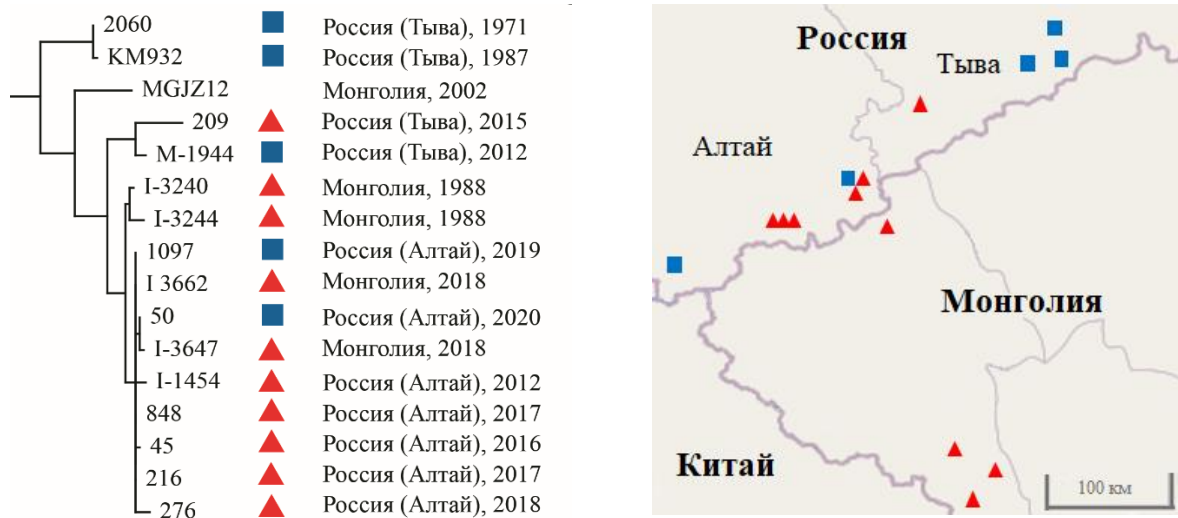
Впервые удалось установить, что штаммы филогенетической ветви 0.ANT5 не способны синтезировать фенилаланин, метионин, треонин, цистеин и лейцин. Штаммы, выбранные для этого исследования, были выделены от одного носителя (серый сурок) в разных природных очагах Кыргызстана в различный период времени. Так, *Y. pestis* 14/1646 был выделен в 1959 г. в Аксайском высокогорном очаге, *Y. pestis* 48 в 2015 г. в Верхненарынском высокогорном. Ранее ауксотрофность штаммов ветви 0.ANT5 рассматривали с привязкой к определенному природному очагу Кыргызстана [Куклева и др., 2013, Куклева и др., 2021], в то время как проведенный филогенетический анализ в совокупности с определением питательных потребностей позволили установить связь ауксотрофности по лейцину с эволюционной ветвью 0.ANT5 античного биовара штаммов возбудителя чумы.

Вторую отличающуюся группу составили штаммы *Y. pestis* филогенетической ветви 1.ANT, которые для роста, помимо трех общих для всех штаммов *Y. pestis* основного подвида аминокислот, нуждались также в цистеине и пролине. Исключение составил штамм *Y. pestis* Kenya To-To, не проявлявший ауксотрофности по пролину, располагающийся в отдельном кластере со штаммом *Y. pestis* Nairobi. Установлено также, что добавление в питательную среду лейцина усиливало рост всех штаммов, выделенных на территории африканского континента. Это может быть связано с нарушением структуры генов пути синтеза лейцина, продукты которых, не утратив своей функциональности, катализируют реакции синтеза лейцина с более низкой скоростью.

Наиболее широко распространенным сочетанием аминокислот, необходимым для большинства филогенетических линий и штаммов *Y. pestis* античного биовара, является

совокупность четырех аминокислот – фенилаланин, метионин, треонин и цистеин. К группе штаммов, нуждающихся в этих факторах роста, относятся штаммы ветвей 0.ANT3, 1.ANT (штамм *Y. pestis* Kenya и To-To), 2.ANT3, 3.ANT2 и ряд штаммов линии 4.ANT из Республик Алтай (*Y. pestis* 50, *Y. pestis* 1097) и Тыва (*Y. pestis* M-1944, *Y. pestis* KM932, *Y. pestis* 2060).

В отдельную группу вошел ряд штаммов филогенетической ветви 4.ANT, которым для полноценного роста достаточно минимального набора из трех аминокислот. Большая часть взятых в исследование штаммов из Тувинского горного очага (исключение составил выделенный в 2015 г. штамм *Y. pestis* 209) являются ауксотрофами по цистеину, в то время как у большинства штаммов из Горно-Алтайского очага рост не зависит от цистеина. В то же время взятые в исследование штаммы *Y. pestis* 4.ANT, выделенные на территории Монголии, не проявляют ауксотрофии по этой аминокислоте. Распределение цистеин-зависимых и независимых штаммов, выделенных на территориях РФ и Монголии приведено на рисунке 3.3.



Красным цветом отмечены штаммы, не нуждающиеся для роста в цистеине,

синим цветом – ауксотрофные по цистеину

Рисунок 3.3 – Места выделения штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT

Согласно литературным данным, штаммы *Y. pestis* из Тувинского горного очага зависят от присутствия в среде метионина и цистеина, тогда как фенилаланин интенсифицировал их рост [Балахонов, 2000]. Кроме того, отмечена географическая приуроченность штаммов с определенными питательными потребностями [Балахонов, 2000; Онищенко,

Кутырев, 2004]. Так, в западной части очага присутствуют варианты штаммов *Y. pestis*, зависимые от метионина и цистеина, в то время как в восточной части очага распространены варианты, зависимые только от метионина. По результатам наших исследований большая часть цистеин-зависимых штаммов располагается в восточной части очага. Возможно, что отличия в результатах обусловлены различной выборкой штаммов *Y. pestis* и различиями в методических подходах при определении питательных потребностей штаммов.

Генетические причины ауксотрофности. Для установления генетических причин зависимости роста штаммов возбудителя чумы от фенилаланина, треонина и метионина проведен сравнительный анализ последовательностей генов метаболических путей синтеза этих аминокислот у референсных штаммов *Y. pestis* CO92 и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953. Наличие мутаций, приводящих к изменению аминокислотных последовательностей продуктов генов и характерных для вида *Y. pestis*, подтверждено сравнением со всеми представленными в NCBI GenBank полногеномными последовательностями, из которых 1041 последовательность относится к виду *Y. pestis*. Список всех генов, анализированных в этом исследовании, приведен в таблице 3.2, результаты сравнения представлены в таблице 3.3.

В целях поиска отличий в генах биосинтеза аминокислот различных филогенетических групп античного биовара основного подвида проводили сравнение последовательностей генов 48 штаммов *Y. pestis* античного биовара из NCBI GenBank с установленной филогенетической принадлежностью [Cui et al., 2013] и 38 штаммов, рассматриваемых в настоящем исследовании. Результаты сравнения 82 генов (Таблица 3.2) штаммов *Y. pestis* античного биовара с различной филогенетической принадлежностью обобщены в таблице 3.4.

Таблица 3.2 – Перечень исследованных генов метаболических путей синтеза фенилаланина, треонина, метионина, цистеина, лейцина, пролина, а также генов, участвующих в обмене серы. Обозначения генов даны по геному штамма *Y. pestis* CO92 (№ доступа GenBank: GCA_000009065.1)

№	Ген	Кодируемый продукт
1	2	3
Фенилаланин		
1	<i>YPO3281 pheA</i>	хоризматмутаза / префенатдегидрогеназа

Продолжение Таблицы 3.2

1	2	3
2	<i>YPO1353</i>	предполагаемая хоризматмутаза
3	<i>YPO3285 tyrA</i>	T-белок [включает: хоризматмутазу и префенатдегидрогеназу]
4	<i>YPO0322 tyrB</i>	аминотрансфераза ароматических аминокислот
5	<i>YPO3343</i>	вероятный внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (циклогексадиенилдегидратаза)
Треонин		
6	<i>YPO3719 apk</i>	лизин-чувствительная аспартокиназа III
7	<i>YPO3949 asd</i>	аспартатполуальдегиддегидрогеназа
8	<i>YPO1357 ltaA</i>	L-алло-треонинальдолаза
9	<i>YPO0116 metL</i>	бифункциональная аспартокиназа/гомосериндегидрогеназа II
10	<i>YPO0459 thrA</i>	бифункциональная аспартокиназа/гомосериндегидрогеназа I
11	<i>YPO0460 thrB</i>	гомосеринкиназа
12	<i>YPO0461 thrC</i>	треонинсинтаза
Лейцин		
13	<i>YPO0533 leuA</i>	2-изопропилмалатсинтаза
14	<i>YPO0530 leuD</i>	малая субъединица 3-изопропилмалатдегидратазы
15	<i>YPO0531 leuC</i>	большая субъединица 3-изопропилмалатдегидратазы
16	<i>YPO0532 leuB</i>	3-изопропилмалатдегидрогеназа
17	<i>YPO3899 ilvE</i>	аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью
Пролин		
18	<i>YPO1851 proA</i>	бифункциональный белок PutA (включает: пролиндегидрогеназу и дельта-1-пирролин-5-карбоксилат)
19	<i>YPO3221 proA</i>	гамма-глутамилфосфатредуктаза
20	<i>YPO3222 proB</i>	глутамат-5-киназа
21	<i>YPO0942 proC</i>	предполагаемая пирролин-5-карбоксилатредуктаза
22	<i>YPO1781 pip</i>	пролиниминопептидаза
Цистеин и обмен серы		
23	<i>YPO4018 cysM</i>	пиридоксальфосфатзависимый белок (цистеинсинтаза)
24	<i>YPO0070 cysE</i>	серинацетилтрансфераза
25	<i>YPO2992 cysK</i>	цистеинсинтаза А
26	<i>YPO3147</i>	предполагаемый пиридоксальфосфатзависимый белок
27	<i>YPO3010</i>	предполагаемый белок
28	<i>YPO3011 cysM</i>	цистеинсинтаза В
29	<i>YPO3012 cysA</i>	АТФ-связывающий белок сульфаттранспортной системы
30	<i>YPO3013 cysW</i>	пермеазный белок CysW сульфаттранспортной системы
31	<i>YPO3014 cysT</i>	пермеазный белок CysT сульфаттранспортной системы
32	<i>YPO3015 cysP</i>	тиосульфатсвязывающий белок
33	<i>YPO1771 sdaA</i>	L-сериндегидратаза
34	<i>YPO0914 serA</i>	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа
35	<i>YPO1288</i>	предполагаемый белок семейства дегидрогеназ 2-гидроксикислот, специфичный для D-изомера (D-3-фосфоглицератдегидрогеназа)
36	<i>YPO1389 serC</i>	фосфосеринаминотрансфераза
37	<i>YPO0278 metC</i>	цистатинин бета-лиаза
38	<i>YPO0681 metC</i>	предполагаемая цистатинин бета-лиаза
39	<i>YPO3006</i>	предполагаемая аминотрансфераза (цистеин-S-конъюгат бета-лиазы)
40	<i>YPO1410 aspC</i>	аспартатаминотрансфераза

Продолжение Таблицы 3.2

1	2	3
41	<i>YPO0116 metL</i>	бифункциональная аспартокиназа/гомосериндегидрогеназа II
42	<i>YPO0459 thrA</i>	бифункциональная аспартокиназа/гомосериндегидрогеназа I
43	<i>YPO3719 apk</i>	лизин-чувствительная аспартокиназа III
44	<i>YPO3949 asd</i>	аспартатполуальдегиддегидрогеназа
45	<i>YPO0931 metK</i>	S-аденозилметионинсинтетаза
46	<i>YPO3384 mtn</i>	Нуклеозидаза МТА/SAH (аденозилгомоцистеин нуклеозидаза)
47	<i>YPO3300 luxS</i>	белок, продуцирующий аутоиндуктор-2 (S-рибозилгомоцистеин лиаза)
48	<i>YPO3012 cysA</i>	АТФ-связывающий белок системы транспорта сульфатов
49	<i>YPO0079 sbp1</i>	связывающий белок системы транспорта сульфатов
50	<i>YPO3013 cysW</i>	пермеаза CysW системы транспорта сульфатов
51	<i>YPO3014 cysT</i>	пермеаза CysT системы транспорта сульфатов
52	<i>YPO3015 cysP</i>	тиосульфат-связывающий белок
53	<i>YPO3365 cysN</i>	субъединица 1 сульфатаденилилтрансферазы
54	<i>YPO3366 cysD</i>	субъединица 2 сульфатаденилилтрансферазы
55	<i>YPO3364 cysC</i>	аденилсульфаткиназа
56	<i>YPO3529 amtA</i>	белок семейства инозитолмонофосфатаз
57	<i>YPO0182 ssiA</i>	предполагаемый таурин-связывающий предшественник периплазматического белка
58	<i>YPO0183 ssiB</i>	предполагаемый тауриновый транспортный АТФ-связывающий белок
59	<i>YPO0184 ssiC</i>	предполагаемый белок пермеазы транспортной системы таурина
60	<i>YPO0185 ssiD</i>	предполагаемая тауриндиоксигеназа
61	<i>YPO3624 ssuA</i>	предполагаемый белок, связывающий алифатические сульфонаты
62	<i>YPO3626 ssuC</i>	предполагаемая пермеаза системы транспорта алифатических сульфонов
63	<i>YPO3627 ssuB</i>	предполагаемый АТФ-связывающий белок системы транспорта алифатических сульфонов
64	<i>YPO3623 ssuE</i>	предполагаемая NAD(P)H-зависимая редуктаза FMN
65	<i>YPO3625 ssuD</i>	алкансульфонатмонооксигеназа
66	<i>YPO0122</i>	консервативный гипотетический белок (тиосульфатсульфотрансфераза)
67	<i>YPO1194</i>	предполагаемая сульфотрансфераза
68	<i>YPO3371 cysI</i>	сульфитредуктаза [НАДФН] бета-компонент гемопротейна
69	<i>YPO3372 cysJ</i>	сульфитредуктаза [НАДФН] флавопротеиновый альфа-компонент
70	<i>YPO3727 metA</i>	гомосерин-О-сукцинилтрансфераза
71	<i>YPO2965 dmsA</i>	предполагаемый белок цепи А диметилсульфоксидредуктазы
72	<i>YPO2966 dmsB</i>	предполагаемый белок цепи В диметилсульфоксидредуктазы
73	<i>YPO2967 dmsC</i>	предполагаемый белок цепи С диметилсульфоксидредуктазы
74	<i>YPO3325 dmsA</i>	предполагаемый белок цепи А диметилсульфоксидредуктазы
75	<i>YPO3324 dmsB</i>	предполагаемый белок цепи В диметилсульфоксидредуктазы
76	<i>YPO3323 dmsC</i>	предполагаемый белок цепи С диметилсульфоксидредуктазы
77	<i>YPO1317</i>	предполагаемый экспортируемый белок
78	<i>YPO1318</i>	предполагаемая ABC-транспортная АТФ-связывающая субъединица

Продолжение Таблицы 3.2

1	2	3
79	<i>YPO1319</i>	предполагаемая транспортная интегральная субъединица мембраны ABC
80	<i>YPO4109</i>	предполагаемая пермеаза системы транспорта аминокислот
81	<i>YPO4110</i>	ABC транспортер пермеаза
82	<i>YPO4111</i>	предполагаемый периплазматический белок, связывающий растворенные вещества

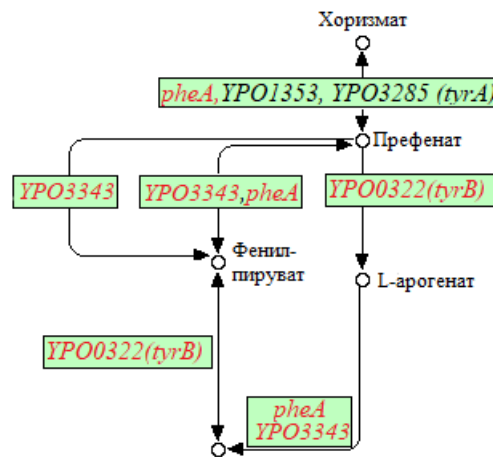
При сравнении полногеномных последовательностей штаммов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, секвенированных в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» и взятых из NCBI GenBank, в 4 генах метаболических путей фенилаланина, треонина, метионина и цистеина было выявлено 4 мутации, приводящие к изменению аминокислотных последовательностей продуктов этих генов, 3 из которых являются не-синонимичными SNPs (от англ. non-synonymous SNP, nsSNP) и одна множественная замена нуклеотидов (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Мутации в генах метаболических путей фенилаланина, треонина, метионина и цистеина, общие для всех штаммов *Y. pestis*

Ген	Кодируемый продукт	Замена нуклеотида	Координаты SNP	Замена аминокислоты
1	2	3	4	5
Фенилаланин				
<i>YPO0322 tyrB*</i>	аминотрансфераза ароматических аминокислот	TC→GA	1080–1081	AspArg→GluSer
<i>YPO3343*</i>	циклогексаденилдегидратаза	G→A	544	Asp→Asn
<i>YPO3281 pheA</i>	циклогексаденилдегидратаза	IS-элемент	–	Сдвиг рамки считывания
Треонин				
<i>YPO3719 ark*</i>	лизин-чувствительная аспартокиназа III	A→T	234	Glu→Asp
Метионин				
<i>YPO0115 metB</i>	цистатионин γ-синтаза	G→нет	988	Сдвиг рамки считывания
<i>YPO3722 metH*</i>	5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин метилтрансфераза	C→T	620	Ala→Val
Цистеин				
<i>YPO3370 cysH</i>	3'-фосфоаденозин 5'-фосфосульфатредуктаза (PAPS)	Делеция 8 п.н.	461 п.н.	Сдвиг рамки считывания

* мутации в генах обнаружены в настоящем исследовании

Биосинтез фенилаланина. Для установления причин ауксотрофности возбудителя чумы по фенилаланину были рассмотрены гены *pheA*, *tyrA*, *tyrB*, *YPO1353*, *YPO3343* (Рисунок 3.4). Ранее основной причиной нарушения синтеза этой аминокислоты считалось внедрение мобильного элемента *IS100* в ген *pheA* бифункционального фермента хоризматмутаза-префенатдегидратаза и, как следствие, нарушение его функциональности [Parkhill et al., 2001]. В нашем исследовании установлено присутствие этой мутации у всех филогенетических ветвей античного биовара, за исключением групп штаммов 0.ANT1 и 2.ANT1 (Таблица 3.4). Однако в силу отсутствия у нас штаммов этих филогенетических ветвей и каких-либо данных об их питательных потребностях не представляется возможным оценить роль этой мутации в проявлении ауксотрофности *Y. pestis* по фенилаланину.



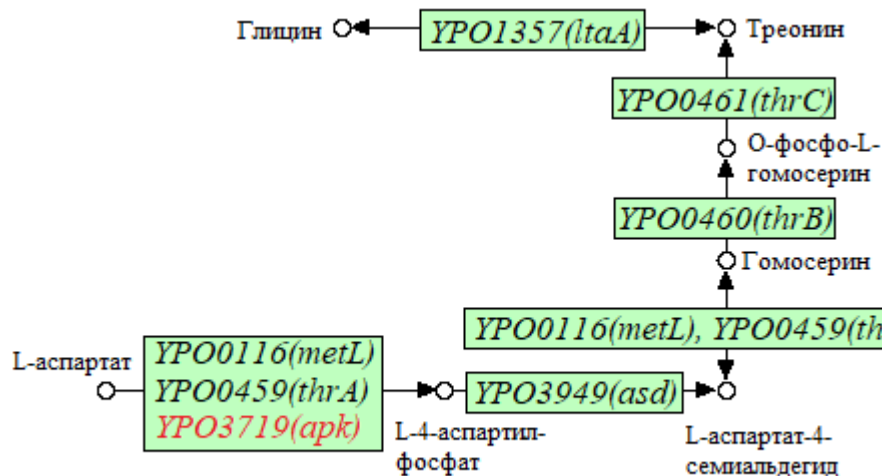
Красным цветом отмечены гены с ранее выявленными и обнаруженными в рамках настоящего исследования мутациями

Рисунок 3.4 – Метаболический путь синтеза фенилаланина *Y. pestis*

Нами при анализе последовательностей генов метаболического пути синтеза фенилаланина взятых в исследование штаммов античного биовара различных филогенетических линий были выявлены nsSNP, приводящие к смене аминокислот в белковых продуктах. В гене *tyrB* штаммов *Y. pestis*, кодирующем аминотрансферазу ароматических аминокислот, по сравнению с геном *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 произошло две аминокислотных замены (TC→GA в позициях 1080–1081 от начала гена, AspArg→GluSer), в то время как в последовательности гена циклогексаденилдегидратазы *YPO3343* был выяв-

лен один nsSNP (G→A в позиции 544 от начала гена, Asp→Asn). Таким образом, выявленное присутствие nsSNPs в генах *tyrB* и *YPO3343*, а также внедрение мобильного элемента *IS100* в ген *pheA* могут быть рассмотрены в качестве вероятных причин ауксотрофности по фенилаланину.

Биосинтез треонина. Анализ метаболического пути синтеза треонина возбудителя чумы проводили при сравнении генов *apk*, *asd*, *ltaA*, *metL*, *thrABC* (Рисунок 3.5). В гене *apk*, кодирующем лизин-чувствительную аспартокиназу III, у всех штаммов возбудителя чумы выявлен один nsSNP (A→T в позиции 234 от начала гена, Glu→Asp). В других исследованных генах мутаций не обнаружено. Таким образом, в результате анализа генов синтеза треонина не было выявлено явных мутаций, сдвигающих рамку считывания. Известно, что обмен треонина и глицина в бактериальной клетке тесно связан с обменом азота. Считается, что именно с нехваткой этого элемента связана универсальная для штаммов *Y. pestis* основного подвида потребность в треонине, в связи с чем поглощение азота происходит менее эффективно посредством преобразований аминокислот, в результате чего скорость роста и размножения бактериальных клеток существенно замедляется [Charusanti et al., 2011]. По этой причине ряд авторов связывает зависимость роста *Y. pestis* от треонина не с ауксотрофностью, а с замедлением роста [Charusanti et al., 2011].



Красным цветом отмечены гены с обнаруженными в рамках настоящего исследования мутациями

Рисунок 3.5 – Метаболический путь синтеза треонина *Y. pestis*

Биосинтез метионина. Метионин, являясь одной из двух серосодержащих аминокислот, играет важную роль в обмене серы (Рисунок 3.6). При сравнении полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* CO92 и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 была выявлена делеция гуанина в позиции 988 гена цистатионин γ -синтазы *metB* [Parkhill et al., 2001]. Впоследствии присутствие этой мутации установлено только у штаммов *Y. pestis* основного подвида, тогда как у неосновных подвидов, способных к синтезу метионина (кавказского, улегейского, центральноазиатского), эта мутация отсутствует [Одинокоев и др., 2011]. При сравнении последовательностей *metB* выявлено присутствие делеции нуклеотида у всех штаммов античного биовара. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания гена *metB* и, как следствие, к ауксотрофности у штаммов античного биовара по метионину.

Синтез метионина у *Y. pseudotuberculosis* происходит двумя путями. В первом случае в качестве субстрата используется гомоцистеин и участвуют продукты генов *metA*, *metC*, *metH*. В кодирующей последовательности 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин-метилтрансферазы *metH*, помимо присутствующей у всех штаммов *Y. pestis* nsSNP (С→Т в позиции 620 от начала гена, Ala→Val), у штаммов линии 4.ANT из Республики Алтай РФ и Монголии выявлена достаточно протяженная инсерция длиной в 74 п.н. Выявленная мутация у штаммов линии 4.ANT может быть использована в диагностических целях в качестве ДНК-мишени, уникальная для штаммов 4.ANT из Сайлюгемского (в состав которого входит Горно-Алтайский высокогорный очаг на территории Российской Федерации) и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан природных очагов чумы.

Кроме гомоцистеина, *Y. pseudotuberculosis* может использовать S-метил-5-тиоаденозин в качестве субстрата, осуществляя синтез метионина с помощью ферментов оперона *mtnKADCB*. При изучении метаболических путей штамма *Y. pestis* CO92 установлено, что этот путь утратил свою функциональность за счет возникшей делеции, сохранившись у штаммов Angola и Pestoides F [Charusanti et al., 2011]. При сравнении геномов *Y. pestis* нами установлено, что участок размером около 8 тыс. п.н. отсутствует в геномах штаммов основного, тибетского и центральноазиатского подвидов, не претерпев изменений у ангольского, кавказского, улегейского и цинхайского подвидов. Кроме оперона *mtnKADCB* также произошла элиминация генов *BZ18_137* и *BZ18_138* (по геному *Y. pestis* Pestoides F). В геноме *Y. pestis* CO92 по месту делеции сохранились интактными гены *hxiB* и *YPO3249*, соответствующие генам *BZ18_131* и *BZ18_139* у *Y. pestis* Pestoides F. Утрата этого региона могла произойти в результате деятельности мобильных генетических элементов или фагов. Также для всех штаммов чумы в отличие от штаммов псевдотуберкулеза выявлено отсутствие гена 1,2-дигидрокси-3-кето-5-метилтиопентен диоксигеназы *YPTB0876*, которое также может быть связано с изменениями в пути утилизации метионина. Следует заметить, что утрата генов *mtnKADCB* ферментов, катализирующих реакции этого пути синтеза метионина, произошла как в геномах штаммов основного подвиды, ауксотрофных по метионину, так и у штаммов *Y. pestis* алтайского и гиссарского биоваров центральноазиатского подвиды, для которых доказано отсутствие этой ауксотрофии. Это позволяет предположить отсутствие влияния выявленной делеции на изменение питательной потребности *Y. pestis* в отношении метионина. Что касается утраты гена 1,2-дигидрокси-3-кето-5-метилтиопентен диоксигеназы *YPTB0876* в геноме *Y. pestis*, то присутствие этой мутации у всех современных штаммов говорит об отсутствии ее влияния на адаптацию разных популяций к условиям разных природных биоценозов.

Биосинтез цистеина. Как и метионин, цистеин является серосодержащей аминокислотой и тесно связан с обменом серы и метионина (Рисунок 3.6). Известно, что в реакциях перехода одной аминокислоты в другую (обратный путь транссульфирования) принимают участие цистатионин- β -синтаза и цистатионин- γ -лиаза: цистатионин- β -синтаза ускоряет образование цистатионина за счет конденсации L-гомоцистеина и серина, тогда как цистатионин- γ -лиаза катализирует синтез цистеина из цистатионина [Guédon, Martin-Verstraete, 2006]. Как упомянуто выше, у штаммов *Y. pestis* основного подвиды ген цистатионин β -синтаза *metB* нарушен в результате сдвига рамки считывания. Что касается

гена цистатионин γ -лиазы, то гомологичные последовательности были обнаружены не у всех представителей рода *Yersinia*. При сравнении гена *uptH* *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (AM286415.1) нами установлена идентичность этих последовательностей 81,53–99,56 % при покрытии 97–100 % у *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. canariae*, *Y. hibernica*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. alsatica*, *Y. bercovieri*, *Y. aleksiciae*, *Y. intermedia*, *Y. massiliensis*, тогда как у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* были выявлены лишь небольшие сходные области этого гена (10 % покрытие, 81,67 % идентичность). Из этого можно заключить, что в результате мутации в гене цистатионин- γ -лиазы *uptH* возбудитель псевдотуберкулеза утратил способность катализировать синтез цистеина из цистатионина, однако сохранил способность переводить эти серосодержащие аминокислоты одна в другую за счет активности цистатионин- β -синтазы. Что касается возбудителя чумы, то он утратил и второй путь перехода между аминокислотами по причине сдвига рамки считывания гена цистатионин- β -синтаза *metB*, в результате чего пути синтеза метионина и цистеина *Y. pestis* связаны только общими метаболитами.

Ранее в метаболическом пути синтеза цистеина в гене *cysH*, кодирующем фосфоаденозинфосфосульфат редуктазу, у штамма *Y. pestis* CO92 была выявлена делеция восьми пар оснований (в позициях 463–470 от начала гена) [Parkhill et al., 2001], присутствующая, как оказалось, у всех штаммов возбудителя чумы. Сдвиг рамки считывания в этом гене привел к невозможности синтеза сульфита из фосфоаденозинфосфосульфата, полученного в ходе преобразований сульфатов, получаемых бактериальной клеткой из окружающей среды. Из-за отсутствия субстрата для сульфитредуктазы, клетка вынуждена использовать другие серосодержащие соединения, такие как тиосульфат и алкансульфонаты. В связи с разнообразием необходимых для синтеза цистеина субстратов и фактом независимости роста некоторых штаммов от присутствия в среде цистеина нарушение в гене *cysH* *Y. pestis* не является причиной ауксотрофности по этой аминокислоте. Нами для установления причин ауксотрофности штаммов возбудителя чумы в отношении цистеина были проанализированы нуклеотидные последовательности 59 генов, ответственных за метаболизм серы и синтез цистеина (Таблица 3.2). Результаты сравнения нуклеотидных последовательностей генов метаболизма серы и цистеина, а также фенилаланина, треонина, метионина, лейцина и пролина 86 штаммов *Y. pestis* античного биовара и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Сравнение изменчивости генов, участвующих в биосинтезе аминокислот у штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических ветвей

Ген	Кодируемый продукт	Мутация, позиция от начала гена*	Филогенетическая ветвь, штаммы
1	2	3	4
Фенилаланин			
<i>YPO3281 pheA</i>	хоризматмутаза-префенатдегидратаза	инсерция IS100	0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT2, 2.ANT3, 3.ANT1, 3.ANT2, 4.ANT
Треонин			
<i>YPO1357 ltaA</i>	треониальдолаза	C→A (680) Gly→Asp	2.ANT2 (Китай)
Метионин, цистеин и обмен серы			
<i>YPO3722 metH</i>	5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин метилтрансфераза	инсерция 74 п.н. (2937–3010)	4.ANT (Монголия, Республика Алтай)
<i>YPO0278 metC</i>	цистеин-S-конъюгированная β-лиаза	C→T (467) Pro→Leu	1.ANT (Кения)
<i>YPO3006 metC</i>		G→C (1139) Ser→Thr	2.ANT
<i>YPO3384 mtn</i>	аденозилгомоцистеиннуклеозидаза	G→A (475) Ala→Thr	1.ANT (ДПК)
<i>YPO3011 cysM</i>	S-сульфо-L-цистеин синтаза (O-ацетил-L-серинзависимая)	делеция 52 п.н. (734–785)	4.ANT (Монголия, Республика Алтай, <i>Y. pestis</i> M-1944, <i>Y. pestis</i> 209 из Республики Тыва)
<i>YPO0182 ssiA</i>	субстрат-связывающий белок транспортной системы таурина	делеция 3 п.н. (547–549)	0.ANT3, 1.ANT
		делеция 91 п.н. (616–705)	1.ANT (Кения)
		делеция 18 п.н. (1042–1059)	1.ANT (ДПК)
<i>YPO3624 ssuA</i>	субстрат-связывающий белок сульфонатной транспортной системы	инсерция 30 п.н.	0.ANT1 – 2.ANT2 3.ANT1, 3.ANT2, 4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, <i>Y. pestis</i> KM932 из Республики Тыва)
		инсерция 15 п.н.	2.ANT3, 4.ANT (Монголия, Республика Алтай, <i>Y. pestis</i> M-1944, <i>Y. pestis</i> 209 из Республики Тыва)

Продолжение Таблицы 3.4

1	2	3	4
<i>YPO3372</i> <i>cysJ</i>	флавопротеиновый α -компонент сульфитредуктазы (НАДФН)	делеция 36 п.н. (655–690)	Линия 1 (1.ANT, 1.ORI, 1.INT)
		делеция 18 п.н. (673–690)	0.ANT1 – 0.ANT5 2.ANT1 – 4.ANT
		G→T (369) Glu→Asp	3.ANT2
<i>YPO4110</i>	пермеаза ABC-транспортера полярных аминокислот	A→T (638) Gln→Leu	2.ANT3 (Внутренняя Монголия)
<i>YPO1319</i>	предполагаемая пермеаза ABC транспортной системы D-метионина	T→C (35) Val→Ala	4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, <i>Y. pestis</i> KM932 из Республики Тыва)
<i>YPO4111</i>	предполагаемый субстрат-связывающий белок транспортной системы полярных аминокислот	делеция 93 п.н. (1–93)	1.ANT
<i>YPO3625</i> <i>ssuD</i>	алкансульфонат монооксигеназа	делеция 5 п.н. (901–905)	0.ANT2
<i>YPO2965</i> <i>dmsA</i>	субъединица А анаэробной диметилсульфоксид-редуктазы	G→T (1172) Arg→Leu	2.ANT
<i>YPO0079</i> <i>sbp1</i>	субстрат-связывающий белок сульфат/тиосульфат транспортной системы	G→A (88) Asp→Asn	3.ANT2 (<i>Y. pestis</i> 137 (19) Berlin, <i>Y. pestis</i> 236 (22))
Лейцин			
<i>YPO0533</i> <i>leuA</i>	2-изопропилмалатсинтаза	делеция 11 п.н. (1409–1419)	0.ANT5
<i>YPO0532</i> <i>leuB</i>	3-изопропилмалат дегидрогеназа	G→A (98) Arg→His	4.ANT (Монголия, Республика Алтай, <i>Y. pestis</i> M-1944, <i>Y. pestis</i> 209 из Республики Тыва)
<i>YPO0530</i> <i>leuD</i>	малая субъединица 3-изопропилмалат дегидратазы	G→A (157) Gly→Ser	1.ANT
Пролин			
<i>YPO1851</i> <i>proA</i>	δ -1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа (регулятор транскрипции RHH-типа)	G→A (8) Ser→Asn	1.ANT
<i>YPO3222</i> <i>proB</i>	глутамат-5-киназа	C→T (149) Ser→Phe	1.ANT (ДПК)
		IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Nairobi)
<i>YPO1781</i> <i>pip</i>	пролин иминопептидаза	IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Antiqua)

* Координаты указаны по последовательностям генов *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (серотип I) (№ доступа GenBank: GCA_000047365.1).

По результатам сравнения последовательностей генов транспортных белков и ферментов, участвующих в обмене серы и синтезе цистеина и метионина, у штаммов *Y. pestis*

филогенетических ветвей античного биовара в 14 генах выявлено 19 мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка (делеции, инсерции, nsSNP) (Таблица 3.4). Кроме того, у большинства групп штаммов выявлен характерный набор мутаций, который может быть использован как для установления причин аукотрофности по цистеину, так и для дифференциации этих филогенетических ветвей (Таблица 3.5).

Анализ полученных данных указывает на то, что кроме общего для всех штаммов возбудителя чумы сдвига рамки считывания в гене *cysH*, у штаммов *Y. pestis* всех филогенетических линий античного биовара присутствуют мутации в генах *ssuA* (кодирует субстрат-связывающий белок сульфонатной транспортной системы) и *cysJ* (кодирует α -компонент сульфитредуктазы). Нарушение структур этих генов у возбудителя чумы (а именно у *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pestis* CO92) по сравнению с *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 было установлено ранее [Chain et al., 2004], однако при сравнении последовательностей этих генов внутри античного биовара нами выявлены различные варианты мутаций, связанные с разным количеством нуклеотидов, подвергшихся делеции или инсерции. Так, у *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 в гене *cysJ* наблюдаются три повтора последовательности длиной 18 п.н., тогда как у штаммов античного биовара присутствует либо два повтора (делеция 18 п.н. у всех групп, кроме 1.ANT), либо один (делеция 36 п.н. у штаммов 1.ANT). Ген *ssuA* возбудителя чумы претерпел обратные изменения, накапливая повторяющиеся последовательности длиной 15 п.н. В гене *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 содержится только один повтор длиной 15 п.н., у большинства штаммов *Y. pestis* присутствует три повтора (инсерция 30 п.н.), у штаммов ветви 2.ANT3 из Китая, России, Монголии и 4.ANT из Монголии, Республики Алтай, Республики Тыва (*Y. pestis* M-1944 и 209) присутствуют только два повтора (инсерция 15 п.н.). Вероятно, мутации в этих генах могли привести к отсутствию селективного давления на сохранение целостности других кодирующих последовательностей продуктов, участвующих в синтезе метионина, цистеина и в обмене серы.

Таблица 3.5 – Характерный профиль мутаций штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара в генах синтеза цистеина, метионина и обмена серы

	<i>methH</i> (+74 п.н.)	<i>metC</i> YPO0278 (nsSNP)	<i>metC</i> YPO3006 (nsSNP)	<i>mtn</i> (nsSNP)	<i>ssuA</i> (+30 п.н.)	<i>ssuA</i> (+15 п.н.)	<i>ssuD</i> (nsSNP)	<i>ssiA</i> (-3 п.н.)	<i>ssiA</i> (-91 п.н.)	<i>ssiA</i> (-18 п.н.)	<i>cysJ</i> (-36 п.н.)	<i>cysJ</i> (-18 п.н.)	<i>cysJ</i> (nsSNP)	<i>cysM</i> (-52 п.н.)	YPO4110*1 (nsSNP)	YPO1319 (nsSNP)	YPO4111 (nsSNP)	<i>dmsA</i> (nsSNP)	<i>spb1</i> *2 (nsSNP)
0.ANT1					+							+							
0.ANT2					+		+					+							
0.ANT3					+			+				+							
0.ANT5					+							+							
1.ANT (ДПК)				+	+			+		+	+						+		
1.ANT (Кения)		+			+			+	+		+						+		
2.ANT1			+		+							+						+	
2.ANT2			+		+							+						+	
2.ANT3			+			+						+		+				+	
3.ANT1					+							+							
3.ANT2					+							+	+						+
4.ANT*3					+							+				+			
4.ANT*4						+						+		+					
4.ANT*5	+					+						+		+					

*1 мутация в гене YPO4110 характерна для штаммов из Китая, области Внутренней Монголии (171 (256), 172 (257), 173 (258)); *2 мутация в гене *spb1* характерна для штаммов 137 (19), Berlin, 236 (22); *3 группа штаммов 4.ANT из Тывы (2060, KM932); *4 группа штаммов 4.ANT из Республики Тыва (M-1944, *Y. pestis* 209); *5 группа штаммов 4.ANT из РФ (Республики Алтай) и Монголии

Часть выявленных мутаций присутствует в генах, связанных с транспортом веществ клеткой из внешней среды (*ssiA*, *ssuA*, *sbp1*, *YPO1319*, *YPO4110*, *YPO4111*). Нарушения в этих генах могут быть как следствием утраты функциональности ферментов, использующихся для транспортировки в клетку веществ в качестве исходных субстратов, так и самостоятельными эволюционными событиями, которые привели к ауксотрофности штаммов по цистеину. Например, мутация в гене субстрат-связывающего белка *ssuA*, участвующего в транспорте сульфатов из внешней среды, могла произойти уже после нарушения функциональности фосфоаденозин фосфосульфат редуктазы (*cysH*), участвующей в ассимиляционной сульфатредукции с образованием сульфита.

На основании данных настоящего и ранее проведенных исследований установлено, что группа штаммов филогенетической линии 4.ANT неоднородна в отношении ауксотрофности по цистеину. В связи с этим имеет смысл проведение анализа по поиску генетических причин ауксотрофности в отношении цистеина именно на примере этой группы штаммов. Опираясь на фенотипические проявления, данные филогенетического анализа и сравнения структур генов штаммы *Y. pestis* линии 4.ANT были разделены на 4 группы:

- 1) ауксотрофные по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Тыва (1971 и 1987 гг.);
- 2) переменные по ауксотрофности по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Тыва (2012 и 2015 гг.);
- 3) переменные по ауксотрофности по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Алтай;
- 4) не зависящие от цистеина штаммы *Y. pestis* из Монголии.

К популяции штаммов, ауксотрофных по цистеину, относятся штаммы *Y. pestis* 2060 и *Y. pestis* KM932, выделенные на территории Тувинского очага чумы во второй половине прошлого столетия. Предшествующее современным штаммам *Y. pestis* линии 4.ANT положение на эволюционном дереве сближает эти штаммы с другими филогенетическими линиями античного биовара, о чем также свидетельствует инсерция 30 п.н. в гене *ssuA*. Эта мутация представляет собой два повтора по 15 п.н. и присутствует у всех филогенетических линий 0.ANT–3.ANT, тогда как у других штаммов линии 4.ANT в этом участке гена *ssuA* содержится только один повтор длиной 15 п.н. Также у этих штаммов выявлена уникальная мутация в гене предполагаемой пермеазы ABC-транспортера D-ме-

тионина *YPO1319*. Следует сказать, что эти штаммы выделены в западной части Тувинского горного очага на территории Каргинской области. По литературным данным известно, что вариабельность зависимости роста в отношении цистеина связывали с географией [Балахонов, 2000; Онищенко, Кутырев, 2004], однако цистеин-зависимые штаммы, напротив, выделялись в восточной части очага, что не соотносится с нашими результатами.

К следующим двум популяциям относятся штаммы из Тувинского (выделены в восточной части очага в XXI веке) и Горно-Алтайского очагов чумы, вариабельные по отношению к цистеину. Штаммы из Тывы образуют обособленный кластер в составе общего кластера со штаммами из Республики Алтай и Монголии. Все эти штаммы обладают общим вариантом мутации в гене *ssuA* (инсерция 15 п.н.), а также делецией 52 п.н. в гене *cysM*, кодирующем S-сульфо-L-цистеинсинтазу. В качестве субстрата для реакции этот фермент использует O-ацетил-L-серин, соединение, необходимое для синтеза цистеина. Вероятно, делеция нарушает структуру этого фермента, вследствие чего весь субстрат будет использован для синтеза цистеина. Однако интактный вариант этого гена присутствует у прототрофного предка возбудителя чумы, *Y. pseudotuberculosis*. Тем не менее, внутри популяций штаммов из Алтая и Тывы наблюдается вариабельность зависимости роста штаммов от цистеина (*Y. pestis* М-1944, *Y. pestis* 1097, *Y. pestis* 50 являются ауксотрофами), что не позволяет однозначно объяснить влияние этих мутаций на ауксотрофность штаммов.

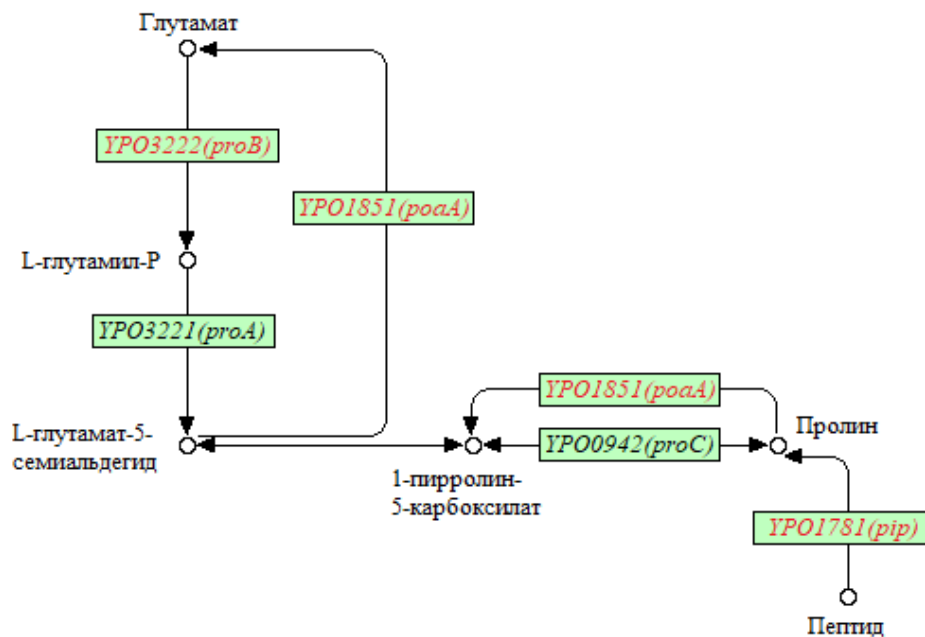
Единственной популяцией штаммов, не проявлявшей зависимости роста от присутствия в среде цистеина, являются штаммы возбудителя чумы, выделенные в природных очагах на территории Монголии в 1988 и 2018 гг. Однако отличий в нуклеотидных последовательностях генов синтеза цистеина, метионина или обмена серы от штаммов из Горно-Алтайского очага нами не выявлено. Помимо описанных выше мутаций была выявлена общая для этой группы штаммов и штаммов из Горно-Алтайского очага инсерция в 74 п.н. в гене *metH*, которая также не коррелирует с отсутствием ауксотрофности штаммов.

Выявленная вариабельность ауксотрофности по цистеину внутри группы штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT привлекает внимание по причине важности этой аминокислоты для патогенных микроорганизмов. Подвергаясь воздействию оксидативного стресса в организме млекопитающего хозяина, патогенные бактерии выработали

стратегии защиты с помощью ряда серосодержащих молекул (тиоредоксин, микотиол, глутатион, тиолы), в синтезе которых непосредственное участие принимает цистеин [Turnbull, Surette, 2010; Burns-Huang, Mundhra, 2019]. Значимость этой аминокислоты подчеркивают работы, согласно результатам которых мутации в генах синтеза цистеина приводят к повышенной восприимчивости к окислительному стрессу штаммов *S. typhimurium*, *Brucella ovis*, *M. tuberculosis* [Turnbull, Surette, 2010; Burns-Huang, Mundhra, 2019; Varesio et al., 2021]. О роли метаболизма серы в приспособлении возбудителя чумы к меняющимся условиям окружающей среды свидетельствуют изменения уровней экспрессии генов *tauABCD*, *ssuEADCB*, *cysPUWAM*, *sbp1*, *YPO1316–YPO1319* и *YPO4108–YPO4111* *Y. pestis* в ответ на большинство экологических стрессов (сдвиги температур, осмотический стресс, высокая осмолярность и соленость, оксидативный и кислотный стресс, низкий уровень Mg^{2+} , железное голодание, обработка антибиотиками) и стремительное поглощение сульфатов из среды клетками *Y. pestis* при воздействии на них оксидативного стресса (H_2O_2) [Zhou et al., 2006; Han et al., 2007]. Вероятно, выявленная вариабельность этого признака у штаммов возбудителя чумы из Горного Алтая является следствием адаптации к условиям местных биоценозов.

Биосинтез лейцина. В нашем исследовании зависимость роста штаммов *Y. pestis* от присутствия в среде лейцина была выявлена у групп штаммов 0.ANT5 и 1.ANT. Для определения причин выявленных потребностей был проведен сравнительный анализ генов *ilvE* и *leuABCD*, продукты которых участвуют в синтезе этой аминокислоты (Рисунок 3.7). В результате сравнения последовательностей найдена делеция 11 п.н. в гене 2-изопропилмалатсинтазы *leuA* (позициях 1409–1419 от начала гена), уникальная для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5. Вероятно, что нарушение функциональности этого фермента вследствие сдвига рамки считывания привело к ауксотрофности этих штаммов в отношении лейцина. Так же в нуклеотидной последовательности гена *leuD*, кодирующего малую субъединицу 3-изопропилмалатдегидратазы, выявлена nsSNP (G→A в позиции 157 от начала гена, Gly→Ser), характерная для штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 1.ANT. Можно предположить, что смена глицина на более разветвленный серин с дополнительной гидроксильной группой могла изменить конформацию этого фермента и повлиять на его активность, что могло бы объяснить слабый рост газонов штаммов на среде без лейцина. Также следует отметить, что у группы штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT (кроме штаммов из Тывы, выделенных в 1971 и 1987

Биосинтез пролина. Для определения генетической причины выявленной ауксотрофии в отношении пролина у штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 1.ANT было проведено сравнение последовательностей генов *proA*, *proABC*, *pip* метаболического пути этой аминокислоты (Рисунок 3.8). Так, у всех штаммов этой группы обнаружен nsSNP (G→A в позиции 8 от начала гена, Ser→Asn) в гене *proA* δ-1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназы, являющейся также регулятором транскрипции RHH-типа. В гене *proB*, кодирующем глутамин-5-киназу выявлен nsSNP (C→T в позиции 149 от начала гена, Ser→Phe), характерный только для группы штаммов, выделенных в ДПК. Также при анализе геномов штаммов *Y. pestis* Antiqua и *Y. pestis* Nairobi в генных путях пролина установлено присутствие мобильных элементов IS100, нарушающих структуры генов *pip* и *proB* соответственно, в то время как в других геномах *Y. pestis* анализируемой группы подобных явлений не выявлено. Таким образом, несмотря на присутствие мутаций в генах биосинтеза пролина, единой причины, однозначно объясняющей ауксотрофность в отношении этой аминокислоты, выявить не удалось.



Красным цветом отмечены гены с выявленными в рамках настоящего исследования мутациями, характерными для штаммов античного биовара

Рисунок 3.8 – Метаболический путь синтеза пролина *Y. pestis*

Таким образом, проведено изучение биохимических свойств 38 штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара из различных очагов мира периода 1928–2020 гг.

Все изученные штаммы обладали типичными для штаммов античного биовара свойствами, а именно денитрификацией, ферментацией глицерина и арабинозы при неспособности утилизировать рамнозу и мелибиозу. При проведении филогенетического анализа установлено, что взятые в исследование штаммы возбудителя чумы принадлежат к филогенетическим ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT. По результатам изучения питательных потребностей штаммов каждой филогенетической ветви установлено, что помимо трех аминокислот (треонин, метионин, фенилаланин), необходимых для роста штаммов основного подвида, для полноценного роста части штаммов также необходимо присутствие в среде лейцина, пролина и цистеина. При изучении питательных потребностей штаммов линии 4.ANT из разных географических районов установлена вариабельность зависимости роста культур от присутствия в среде цистеина. Неоднородность группы штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT в отношении зависимости роста от цистеина может быть связана как с закономерными эволюционными процессами, происходящими внутри вида вследствие приспособления к паразитическому существованию, так и с адаптацией к конкретным ландшафтно-географическим условиям. Наличие ауксотрофности по комплексу питательных потребностей и наличие множественных мутаций в генах метаболических путей аминокислот треонина, метионина, фенилаланина, цистеина, лейцина, пролина, а также обмена серы свидетельствует о деградации генома возбудителя, невозможности самостоятельного существования *Y. pestis* античного биовара в природных биоценозах и необходимости использования других организмов, питательные ресурсы и высокая численность которых обеспечит сохранение и размножение возбудителя. Также анализ метаболических путей синтеза аминокислот позволил выявить ряд замен, влияющих на функциональность ферментов, которые могут быть использованы в качестве генетических меток для типирования и дифференциации штаммов *Y. pestis* различных филогенетических групп античного биовара. Актуальность изучения генетических характеристик штаммов *Y. pestis* подчеркивается объявленной в 2022 г. Всемирной организацией здравоохранения 10-летней стратегией глобального геномного надзора за патогенными организмами, способными вызывать эпидемии и пандемии [Carter et al., 2022].

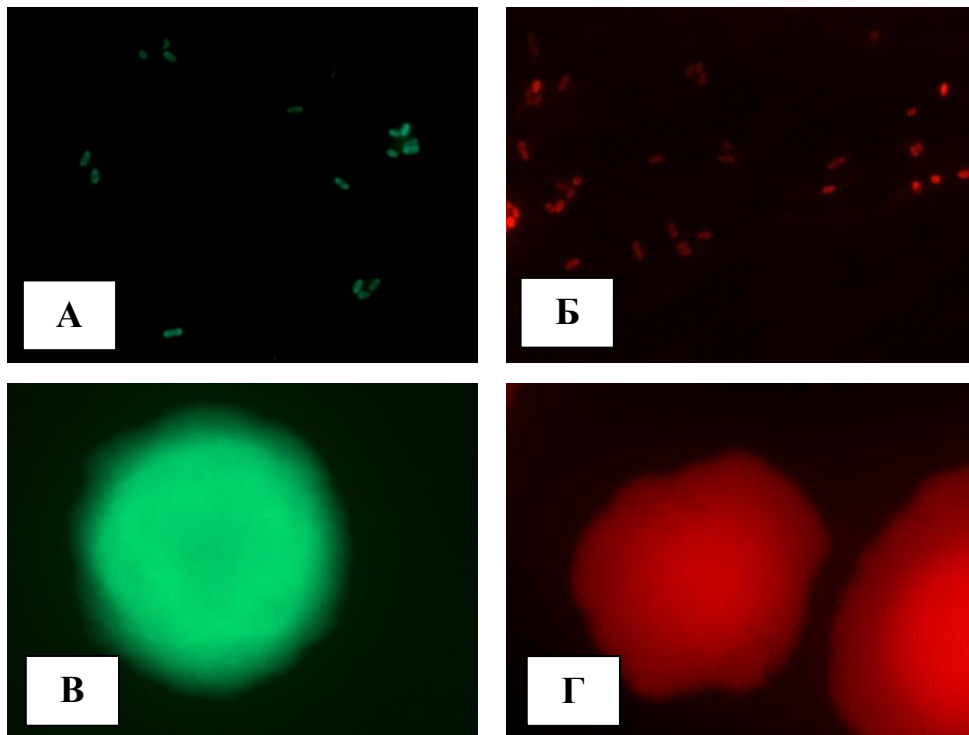
3.2 Получение рекомбинантных флуоресцентных штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с использованием плазмид pTurboGFP-B и pKatushka-2S

Для проведения экспериментов по изучению особенностей персистенции *Y. pestis* при участии членов почвенной микрофауны, в том числе по установлению локализации бактериальных клеток внутри макроорганизма, необходимы особые методические подходы. Традиционные этапы пробоподготовки образцов для микроскопирования требуют специальных реактивов, оборудования и временных затрат. Кроме того, большинство методов не позволяют прижизненно наблюдать за взаимодействиями организмов. В связи с этим возникает необходимость введения легко детектируемой метки в изучаемый бактериальный штамм, благодаря которой будет возможна визуализация клеток бактерий внутри других организмов. Наиболее простыми и эффективными в использовании являются флуоресцентные белки, гены которых вводятся в бактериальный геном в составе плазмид. Таким образом, следующим этапом настоящего исследования было конструирование флуоресцентного штамма *Y. pestis* античного биовара основного подвида.

Для конструирования флуоресцентных штаммов использовали два варианта векторных конструкций, несущих два разных флуоресцентных белка. Плазмида pTurboGFP-B (Евроген, Россия) размером 4103 п.н. имеет в своем составе ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP с максимумом возбуждения/испускания 482/502 нм. Другим вектором стала плазмида pKatushka2S-B (Евроген, Россия) размером 4138 п.н., которая содержит ген красного флуоресцентного белка Katushka2S с максимумом возбуждения/испускания 588/633 нм. Автономность конструкций обусловлена наличием в них точки начала репликации ColE1. Помимо этого векторные плазмиды в своем составе имеют селективный ген β -лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину, что позволяет проводить отбор целевых колоний бактерий от других микроорганизмов.

В качестве реципиентного использовали штамм античного биовара основного подвида *Y. pestis* 216, выделенный в 2017 г. от серого сурка (*M. baibacina*) на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Компетентные клетки получали по методике R. Conchas, E. Carniel [Conchas, Carniel, 1990]. Процедура трансформации клеток методом электропорации штаммов *Y. pestis* плазмидами pTurboGFP-B и pKatushka2S-B была осуществлена в соответствии с инструкцией производителя и описана в соответствующем

разделе 2 Материалы и методы. Морфология прошедших трансформацию клеток и колониальный возбудителя чумы представлена на рисунке 3.9.



А – клетки *Y. pestis* KM2083, длина волны эмиссии 502 нм, увеличение 1500х; Б – клетки *Y. pestis* KM2084, длина волны эмиссии 633 нм, увеличение 1500х; В – колонии *Y. pestis* KM2083, длина волны эмиссии 502 нм, увеличение 100х; Г – колонии *Y. pestis* KM2084, длина волны эмиссии 633 нм, увеличение 100х. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия)

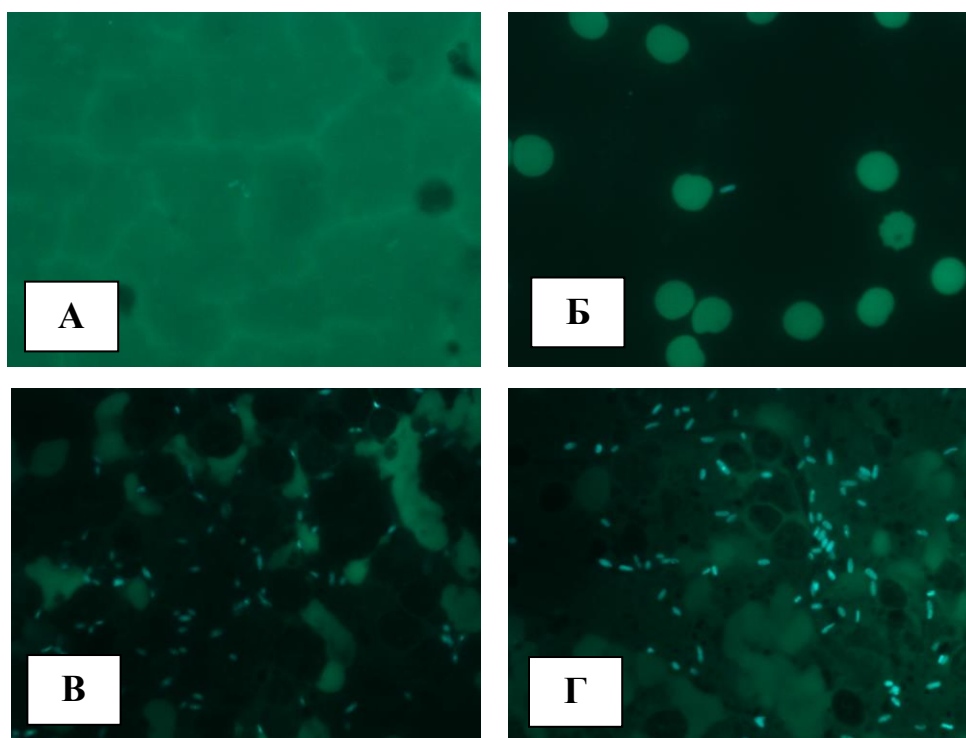
Рисунок 3.9 – Морфологические свойства клеток и колоний штаммов *Y. pestis* после трансформации плазмидами pTurboGFP-B и pKatushka2S-B

Полученные рекомбинантные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий на базе ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора под номерами: *Y. pestis* KM2083 – содержит плазмиду pTurboGFP-B; *Y. pestis* KM2084 – содержит плазмиду pKatushka2S-B.

На плотной питательной среде LB штаммы формируют колонии желто-зеленого или розового цвета, структура и морфология которых идентична исходному штамму. При

просмотре под микроскопом под действием определенной длины волны колонии флуоресцировали, а клетки имели вид ярко окрашенных биполярных палочек зеленого или красного цвета в зависимости от встроенной в геном штамма плазмиды. В бульоне LB характер роста полученных рекомбинантных штаммов аналогичен исходному за исключением слабо заметного зеленого или розового оттенка придонного осадка. При сравнении биохимических свойств установлено отсутствие различий между исходным и рекомбинантными штаммами. Флуоресцентные штаммы обладают чувствительностью к бактериофагам псевдотуберкулезному, Л413-С и чумному Покровской в диагностическом титре

Отсутствие влияния трансформации плазмидами на вирулентность штаммов у флуоресцентных и исходного штаммов, а именно сохранение детерминант вирулентности (области *hms*-оперона и плазмиды pCad) у флуоресцентных и исходного штаммов, доказано зависимостью роста от наличия в питательной среде ионов Ca^{2+} при 37 °С и способностью сорбировать пигмент из среды, содержащей краситель (Конго красный). При проверке вирулентности рекомбинантных штаммов *in vivo* методом подкожного заражения беспородных белых мышей установлено, что все штаммы вызывали гибель животных в дозах 1×10^3 и 1×10^4 КОЕ/мл. Вскрытие павших животных показало типичную патолого-анатомическую картину чумы, при посеве отпечатков органов (регионарные лимфоузлы, печень, селезенка) на плотные среды через 48 ч выявляли окрашенные колонии. При просмотре мазков-отпечатков органов и крови животных во всех образцах были обнаружены биполярные клетки *Y. pestis*, обладающие флуоресценцией в зеленом и красном спектрах на 3 и 4 креста (Рисунок 3.10).



А – легкие; Б – кровь; В – печень; Г – селезенка. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Длина волны эмиссии 502 нм, увеличение 1500х

Рисунок 3.10 – Флуоресценция клеток *Y. pestis* KM2083 в мазках органов павших беспородных мышей

Для установления возможности использования рекомбинантных флуоресцентных штаммов *Y. pestis*, содержащих плазмиды pTurboGFP-B и pKatushka2S-B, при изучении взаимодействия с простейшими, проводили совместное культивирование этих организмов. Аксеническую культуру акантамеб *A. castellanii* 13А, выделенную на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, культивировали в среде PYG при 22 °С до накопления концентрации трофозоитов от 1×10^4 до 1×10^6 клеток/мл, отмывали в солевом растворе АВ и центрифугировали в течение 15 мин на скорости 4000 об/мин. Рекомбинантный флуоресцентный штамм *Y. pestis* культивировали на среде LB (рН 7,2) с добавлением 50 ед/мл ампициллина при 28 °С в течение 24 ч. Суспензию клеток штамма в буфере АВ в концентрации 1×10^9 клеток/мл объединяли с культурой акантамеб в соотношении 10:1 (10000 клеток *Y. pestis* к 1000 клеток амев в 1 мл) и культивировали при 22 °С и влажности 60 % в течение 21 дня в буфере АВ с добавлением 50 ед/мл ампициллина.

По окончании времени эксперимента готовили мазки для флуоресцентной микроскопии. На предметное стекло наносили 10 мкл образца, подсушивали и фиксировали в

70 % спирте в течение 30 минут. При совместном культивировании рекомбинантных штаммов *Y. pestis* с клетками амёб *A. castellanii* 13А в жидкой среде при просмотре мазков установлено присутствие бактериальных клеток внутри амёб и в супернатанте. Клетки возбудителя чумы четко визуализировались в виде биполярных палочек зеленого или красного цвета.

Таким образом установлено, что трансформация плазмидами, несущими в своем составе гены, кодирующие флуоресцентные белки, не привела к изменению культурально-морфологических и биохимических свойств, чувствительности к бактериофагам и вирулентности штаммов *Y. pestis*. Клетки возбудителя чумы четко визуализировались в мазках-отпечатках органов павших животных и внутри клеток амёб *A. castellanii*. Использование штаммов, экспрессирующих флуоресцентные белки, в экспериментах по взаимодействию *Y. pestis* с амёбами и с макроорганизмом лабораторного животного упрощает и ускоряет процесс детекции и определения местонахождения клеток *Y. pestis* в образцах за счет флуоресценции в известной области спектра. Способность расти на средах, содержащих антибиотик ампициллин, дает преимущество при селекции целевых объектов от колоний, образуемых посторонней микрофлорой из органов павших животных.

В Главе 3 по результатам изучения свойств штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических линий 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT установлено, что штаммы этой группы обладают типичными для штаммов античного биовара свойствами. Общими питательными потребностями исследуемых групп штаммов являются зависимость роста от присутствия в среде треонина, метионина, фенилаланина, тогда как для различных филогенетических групп установлены дополнительные потребности в лейцине, пролине и цистеине. Внутри вида *Y. pestis*, а также внутри различных филогенетических групп античного биовара выявлены мутации в генах синтеза этих аминокислот. Отличительной особенностью штаммов филогенетической линии 4.ANT является вариабельность зависимости роста от присутствия в среде цистеина, которая может быть связана с приспособлением к определенным биоценозам. Результаты филогенетического анализа, анализа зависимости роста от цистеина и сравнения 59 генов биосинтеза цистеина и обмена серы позволили выявить 4 отдельные популяции среди филогенетической линии 4.ANT. Популяция штаммов из Горно-Алтайского высокогорного очага продемонстрировала вариабельность зависимости роста от цистеина и обладала сходным профилем

мутаций со штаммами, выделенными на территории Монголии, что подтверждает определение этого очага как северной части Сайлюгемского очага Монголии. Выявленные зависимости роста штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT от присутствия в среде аминокислот необходимы для планирования экспериментов по моделированию взаимодействия с почвенной микрофауной. Для дальнейших экспериментов по изучению взаимодействия возбудителя чумы с членами почвенной микрофауны с помощью плазмид pTurboGFP-B и pKatushka2S-B были сконструированы флуоресцентные штаммы *Y. pestis*, упрощающие детекцию бактериальных клеток в образцах за счет флуоресценции в заданной области спектра.

ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ШТАММОВ *Y. pestis* ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT С ПРОСТЕЙШИМИ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА

Несмотря на более чем вековую историю изучения природной очаговости чумы, вопрос сохранения *Y. pestis* во время межэпизоотических периодов не теряет своей актуальности. Одним из возможных механизмов персистенции возбудителя чумы является использование возбудителем почвенных простейших в качестве резервуаров, в которых *Y. pestis* может размножаться и пережидать неблагоприятные условия окружающей среды. Для проведения приближенных к реальным условиям экспериментов наиболее целесообразным является использование организмов, выделенных с территории одного биоценоза. С этой целью для изучения взаимодействий могут быть использованы культуры простейших и штаммы возбудителя чумы, выделенные из эпизоотически активных в настоящий момент очагов, одним из которых является Горно-Алтайский высокогорный очаг чумы. Помимо изучения закономерностей взаимодействия *Y. pestis* с простейшими, актуальным является вопрос влияния длительного сокультивирования с простейшими на основные свойства возбудителя чумы, необходимые для сохранения эпидемического потенциала штаммов *Y. pestis*. Таким образом целью данного раздела было изучение взаимодействий штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT и культуры амёб, выделенных на территории Горно-Алтайского очага чумы, и определение влияния длительного совместного культивирования на свойства возбудителя чумы.

4.1 Систематическая принадлежность простейших из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага

Разнообразие простейших из почв нор грызунов оценивали на участках с выраженной эпизоотической активностью Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Сбор проб осуществляли в 2016 г. на 10 участках (с номерами 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 18, 20) по методу конверта на четырех глубинах (от 10 до 120 см), объединяя навески почв в одну в целях формирования независимой и репрезентативной выборки простейших (Рисунок 4.1). Выделение аксенических культур простейших проводили путем культивирования

вытяжек почвы на плотной среде NGM с газоном *E. coli* OP50 и в жидкой питательной среде PYG с добавлением антибиотиков (Глава 2 Материалы и методы).

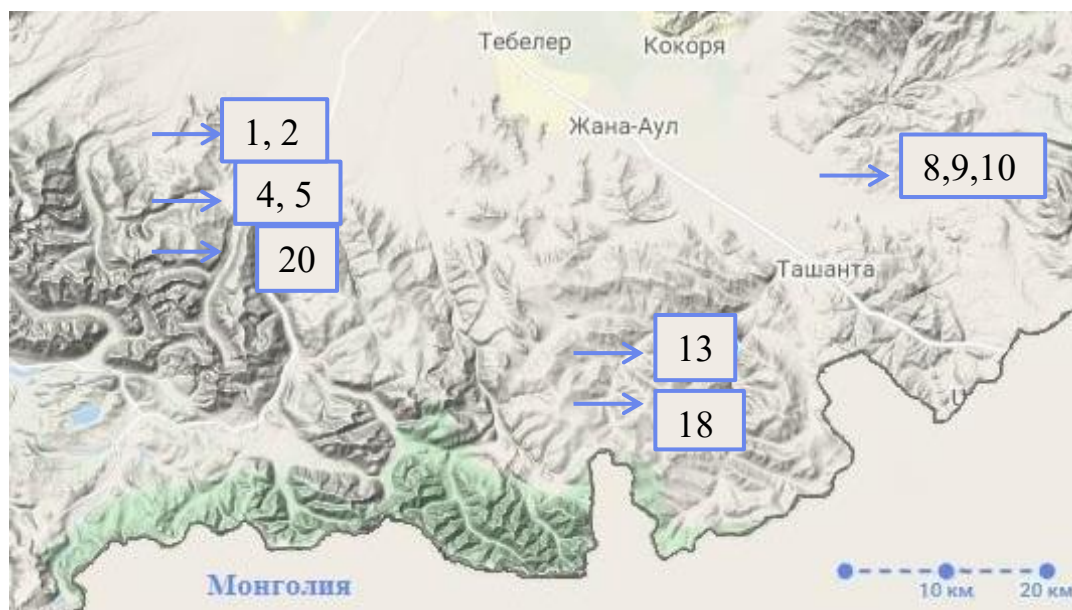
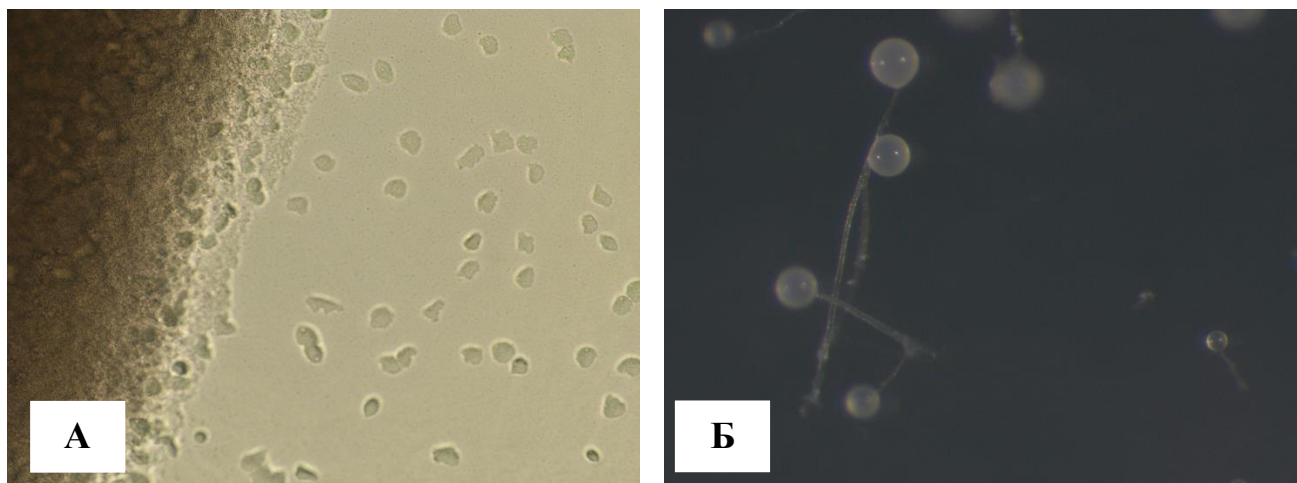


Рисунок 4.1 – Места сбора проб почвы из нор грызунов на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

В результате культивирования вытяжек почвы из нор грызунов получены 15 культур простейших, по морфологическим признакам относящихся к двум разным группам (Рисунок 4.2). Первую группу составляли простейшие, клетки которых обладали амебной формой и были способны к образованию цист. Ко второй группе изолированных из почв простейших были отнесены одноклеточные организмы, образующие агрегаты с формированием сложных плодовых тел. Судя по морфологии, эти организмы относятся к группе клеточных миксомицетов *Dictyostelium*. Штаммы простейших обозначили по номерам точек, из которых были собраны образцы почв, с добавлением начальных букв групп, к которым были отнесены организмы. Таким образом из участков с номерами 1, 2, 4, 5, 10, 13, 18 и 20 были получены культуры цистообразующих амёб 1А, 2А, 4А, 5А, 10А, 13А, 18А и 20А, из точек 4, 5, 10, 13 8, 9 – культуры диктиостелид 4D, 5D, 8D, 9D, 10D, 13D, 18D.



А – трофозоиты цистообразующих амёб, микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 100х, Б – плодовые тела простейших рода *Dictyostelium*, стереомикроскоп SteREO Discovery.V8 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 40х
 Рисунок 4.2 – Морфология простейших, выделенных из почв нор грызунов из Горно-Алтайского очага чумы

В основе систематики простейших лежат особенности морфологии, в частности цист для цистообразующих амёб и сорокарпов (плодовые тела, несущие споры) для диктиостелид. Однако по причине высокой изменчивости морфологических признаков определение систематической принадлежности простейших является сложной задачей, в особенности на подродовом уровне. Известно, что изменение морфологии цист амёб зависит от условий культивирования, а высокая изменчивость формы сорокарпов миксомицет делает невозможным поиск и определение взаимосвязи между морфологией и таксономией [Stratford, Griffiths, 1978; Schaap et al., 2006]. В связи с этим установление систематической принадлежности выделенных амёб проводили по более устойчивым признакам, таким как ДНК организмов. В качестве генетических маркеров использовали гены рРНК простейших, достаточно полно представленные в базах данных и обладающие высокой вариабельностью нуклеотидных последовательностей с высоким разрешением, обеспечивающих определение систематического положения организма до рода и вида.

Нуклеотидные последовательности участков рибосомальных генов цистообразующих амёб получали в ПЦР с праймерами JDP1/JDP2 на фрагмент гена 18S рРНК (5'GCCCAGATCGTTTACCGTGAA3', 5'TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA3', температура отжига – 59 °C) [Schroeder et al., 2001]. Для работы с родом *Dictyostelium* нами были рассчитаны специфичные праймеры AR_D_F/AR_D_R

(5'TCCCTGCCSTTTGTACACAC3', 5'TATTCCGTCTTCACTCGCCG3', температура отжига – 55 °С) на нуклеотидные последовательности региона, содержащего консервативные участки генов 17S, 5.8S, 26S и разделяющие их последовательности внутренних спейсеров ITS1 и ITS2 (эти организмы отличаются от других эукариот меньшим коэффициентом седиментации рРНК [Kessin, 2001]). Расчет праймеров проводили с помощью онлайн-сервиса Primer3Plus на основе последовательностей из международной базы данных NCBI GenBank. После определения нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР методом капиллярного секвенирования осуществляли анализ полученных данных с помощью локального выравнивания программой NCBI BLAST алгоритмом megablast. Данные сравнения общих участков последовательностей генов рРНК простейших почв Горно-Алтайского высокогорного очага с последовательностями, представленными в базе данных NCBI GenBank, представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Анализ нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов культур амёб, выделенных из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

Название изолята	Длина фрагмента, п.н.	Последовательность с наибольшим процентом совпадений	Покрытие, %	Идентичность, %
1	2	3	4	5
Участок 18S <i>Acanthamoeba</i> spp.				
1A	452	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	100	99,34
2A	416	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	100	99,76
4A	446	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	97	100,00
5A	431	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	99	97,25
		<i>Acanthamoeba</i> sp. RS1F2.SAR	99	100,00
10A	448	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	99	100,00
13A	449	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	100	100,00
18A	443	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	100	99,79
20A	457	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 50373	100	99,13
фрагмент 17S – ITS1– 5.8S – ITS2 – фрагмент 26S рРНК <i>Dictyostelium</i> spp.				
1D	928	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,35
2D	876	<i>D. sphaerocephalum</i> 89B	100	100,00

Продолжение Таблицы 4.1

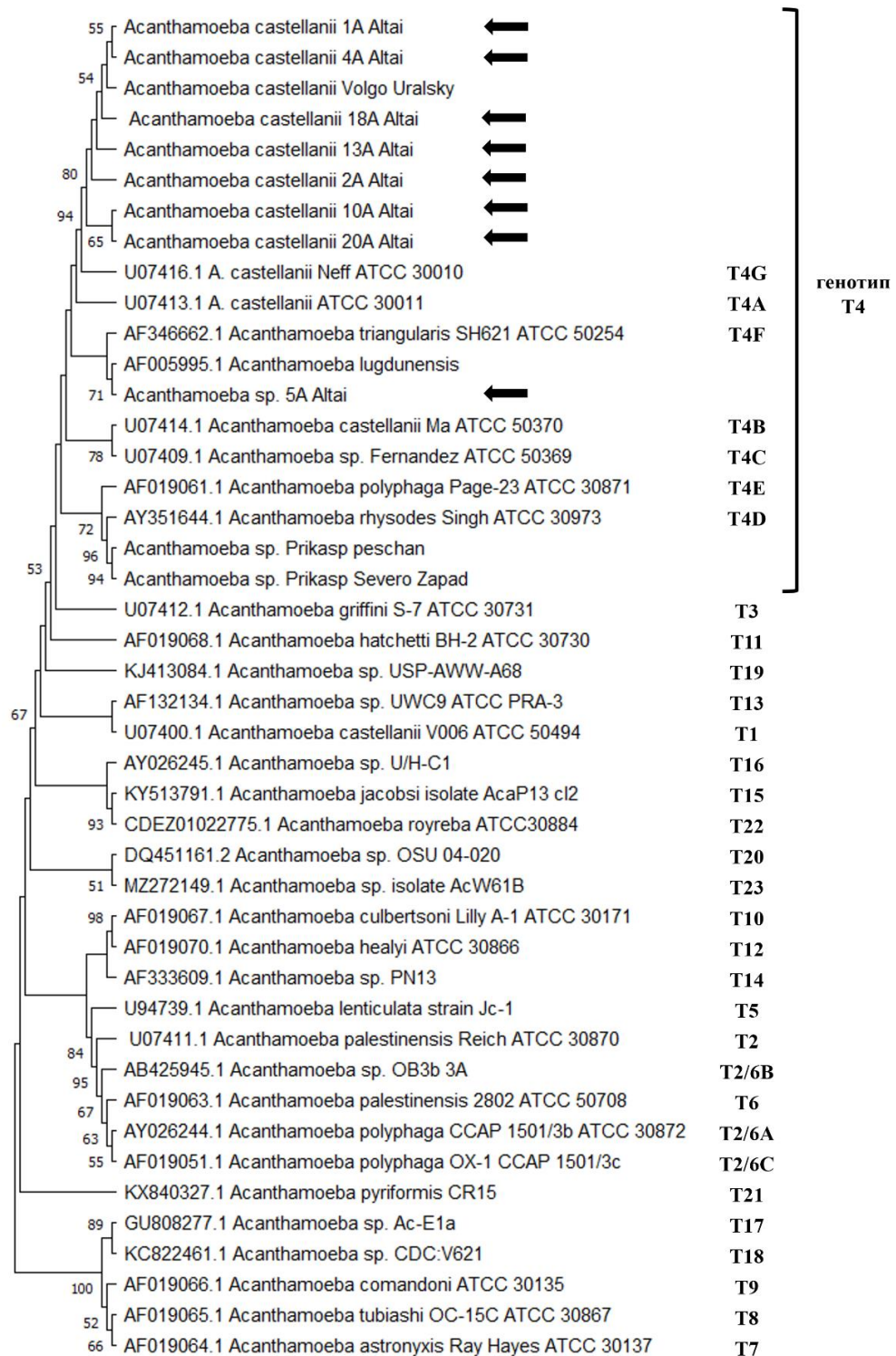
1	2	3	4	5
4D	928	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,89
5D	886	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,89
8D	877	<i>D. sphaerocephalum</i> 89B	100	99,89
9D	928	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,89
10D	928	<i>D. sphaerocephalum</i> 89B	100	99,89
13D	928	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,78
18D	727	<i>D. mucoroides</i> G81	100	99,59

По результатам анализа нуклеотидных последовательностей участка гена 18S рРНК (размером от 431 до 457 п.н.) цистообразующих амёб (изолятов 1А, 2А, 4А, 5А, 10А, 13А, 18А и 20А) установлен высокий процент гомологии (97–100 %) с последовательностями генов амёб рода *Acanthamoeba* при покрытии генома 99–100 %, что однозначно доказывает принадлежность выделенных амёб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага к этому роду. Кроме того, идентичность нуклеотидных последовательностей 18S рРНК образцов 1А, 2А, 4А, 10А, 13А, 18А и 20А и депонированной в базе данных NCBI GenBank нуклеотидной последовательности *A. castellanii* Neff ATCC 50373 выше 99 % свидетельствует о видовой принадлежности выделенных амёб к виду *A. castellanii*. Процент гомологии участка гена 18S рРНК изолята 5А отличается от остальных образцов из почв Горного Алтая, сходство с референсной последовательностью *A. castellanii* Neff ATCC 50373 составляет 97,25 %, что не позволяет однозначно судить о видовой принадлежности этого организма.

При анализе участков генов рРНК амёб рода *Dictyostelium*, полученных в ходе капиллярного секвенирования ПЦР-продуктов размером от 876 до 928 п.н., была выявлена высокая степень гомологии последовательностей исследуемых штаммов (99–100 %) с последовательностями *Dictyostelium* при 100 % покрытии. На основании сравнения последовательностей установлена гомология (99,35–99,89 %) изолятов 1D, 4D, 5D, 9D, 13D, 18D с *D. mucoroides* G81, тогда как изоляты 2D, 8D, 10D наиболее близки к *D. sphaerocephalum* 89B (99,89–100 %). Однако в результате анализа последовательностей 17S–ITS1 ранее было предложено отнести изолят *D. mucoroides* G81 к комплексу видов *D. sphaerocephalum* [Romeralo et al., 2010]. С учетом возможного расхождения процентов

гомологии внутри вида *D. sphaerocephalum* по последовательностям ITS1–5,8S–ITS2, равного 0–1,75 % [Romeralo et al., 2007], и полученных данных в ходе сравнения нуклеотидных последовательностей амёб из Горного Алтая (Таблица 4.1), можно констатировать принадлежность всех выделенных изолятов к виду *D. sphaerocephalum*.

В целях установления филогенетических связей простейших, выделенных из почв нор грызунов Горно-Алтайского очага чумы, была сформирована выборка последовательностей генов рРНК исследуемых образцов и других представителей родов *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* из базы данных NCBI GenBank. Филогенетический анализ и визуализацию полученной дендрограммы проводили в программе Mega 11 с использованием алгоритма Maximum Likelihood (модель Tamura-Nei). Консенсусное дерево получали методом бутстреп с 500 повторениями. Результаты филогенетического анализа представлены на рисунках 4.3 и 4.4.



Программа Mega 11, алгоритм Maximum Likelihood, модель Tamura-Nei, 500 бутстреп-реплик. Стрелками отмечены изоляты из Горно-Алтайского очага

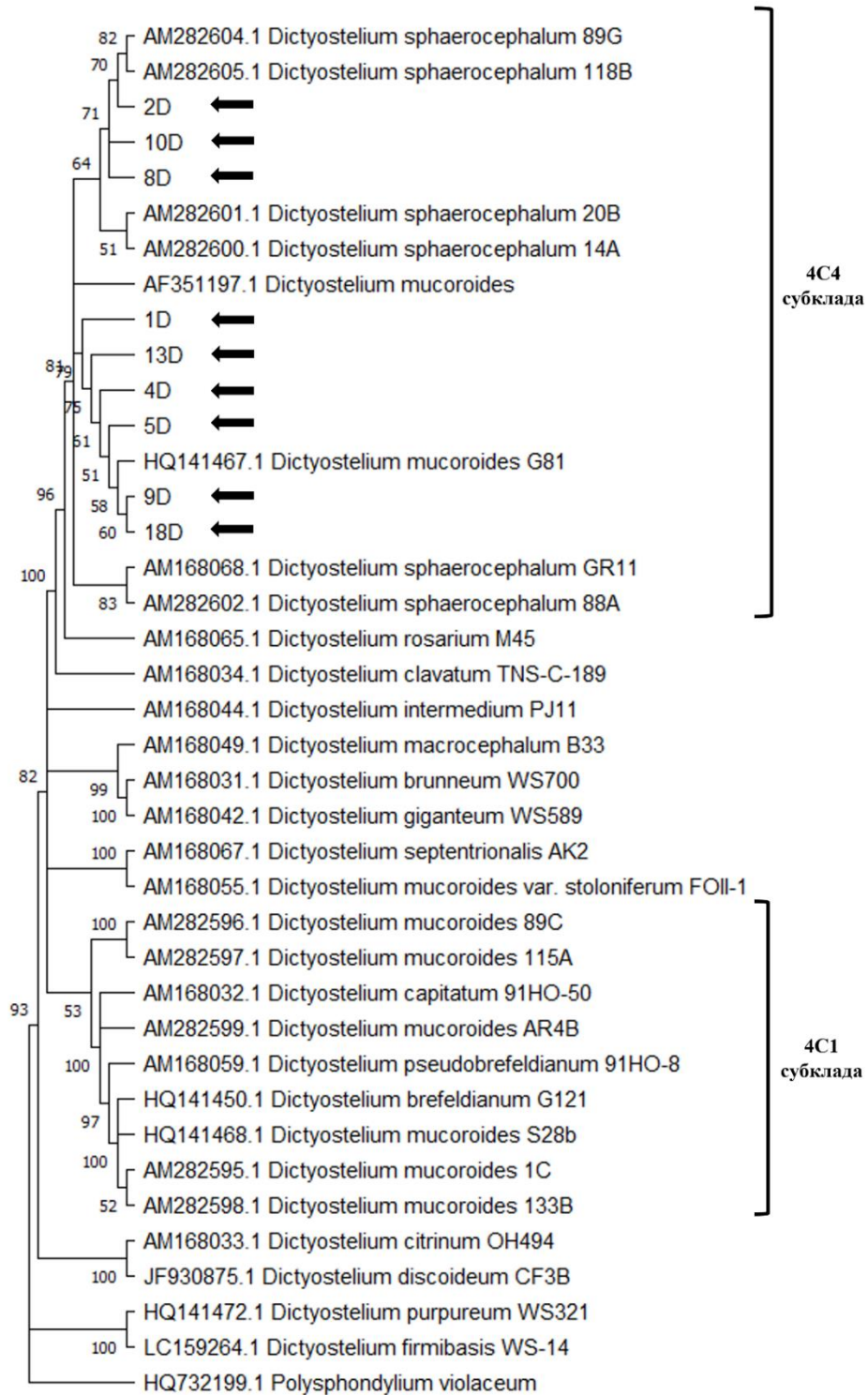
Рисунок 4.3 – Анализ филогенетических связей простейших рода *Acanthamoeba* различных генотипов из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по последовательностям участка 18S рНК

На основании анализа данных генов рРНК к настоящему моменту внутри вида *Acanthamoeba* выделяют 23 генотипа [Putaporntip et al., 2021]. Наиболее многочисленной группой является генотип Т4, к которому относятся исследованные в настоящей работе культуры акантамеб (Рисунок 4.3). Входящие в этот генотип виды акантамеб вызывают акантамебный кератит и гранулематозный амёбный энцефалит, при том что 86 % всех случаев акантамебного кератита вызваны именно генотипом Т4 [Diehl et al., 2021]. Изоляты *A. castellanii* 1А, 2А, 4А, 10А, 13А, 18А и 20А в соответствии с ранее установленным процентом идентичности кластеризуются с типовым штаммом *A. castellanii* Neff ATCC 30010 субгенотипа Т4G со статистически значимой поддержкой ветви, равной 94. Это подтверждает принадлежность исследуемых культур простейших, выделенных на разных участках Горно-Алтайского высокогорного очага, к виду *A. castellanii*. Изолят *Acanthamoeba* sp. 5А формирует общий кластер с *A. lugdunensis* и *A. triangularis* SH621 ATCC 50254, что позволяет сделать вывод о принадлежности этого изолята к другому виду и субгенотипу.

Также следует отметить, что изоляты акантамеб, ранее выделенные на территории природных очагов чумы Прикаспия, относятся к тому же генотипу Т4, что и выделенные нами акантамебы из Горно-Алтайского высокогорного очага. Изоляты из Прикаспийского песчаного и Прикаспийского Северо-Западного очагов образуют единый кластер с *A. rhyodes* Singh ATCC 30973 и *A. polyphaga* Page-23 ATCC 30871 (субгенотипов Т4D и Т4Е соответственно), а *A. castellanii* из Волго-Уральского степного очага входит в большой общий кластер с *A. castellanii* из Горно-Алтайского очага. Выявление акантамеб на этих территориях свидетельствует о широком распространении *Acanthamoeba spp.* генотипа Т4 в почвах природных очагов чумы степной зоны России. Глобальное распространение акантамеб в окружающей среде, устойчивость цист к ее неблагоприятным воздействиям, а также многочисленные публикации по обнаружению патогенных вирусов и бактерий в акантамебах позволяют говорить об их возможной роли в сохранении возбудителя чумы в почвах на территории природных очагов чумы [Aksozek et al., 2002; Marciano-Cabral, Cabral, 2003; Greub, Raoult, 2004].

При анализе филогении диктиостелид (*Dictyostelia*) на основании молекулярных данных генов 17S рРНК все виды были разделены на 4 основных группы [Schaap et al., 2006]. Установлено, что *Dictyostelium* является парафилетическим таксоном с различными морфологическими признаками, независимо возникавшими в процессе эволюции

[Schaap et al., 2006; Romeralo et al., 2010]. Виды *D. mucoroides* и *D. sphaerocephalum*, к которым с наибольшим процентом гомологии относятся изоляты, выделенные из почв Горно-Алтайского высокогорного очага, входят в 4 группу, в которой взаимоотношения на видовом уровне являются наименее разрешенными. В целях анализа филогенетических связей выделенных на территории Горно-Алтайского очага чумы *Dictyostelium spp.* была сформирована выборка из 29 последовательностей 17 видов этой группы организмов. Для укоренения дендрограммы использовали последовательность *Polysphondylium violaceum* [Schaap et al., 2006]. Результаты филогенетического анализа представлены на рисунке 4.4.



Программа Mega 11, алгоритм Maximum Likelihood, модель Tamura-Nei, 500 бутстреп-реплик. Стрелками отмечены изоляты из Горно-Алтайского очага

Рисунок 4.4 – Анализ филогенетических связей простейших рода *Dictyostelium* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по последовательностям генов 17S–ITS1–5.8S–ITS2–26S рРНК

В соответствии с установленным процентом гомологии все исследуемые изоляты из Горно-Алтайского высокогорного очага образовали общий кластер с представителями *D. sphaerocephalum* и некоторыми изолятами *D. mucoroides*. Как обсуждалось ранее, изоляты *D. mucoroides* в субкладе 4C4 было решено отнести к комплексу видов *D. sphaerocephalum*, тогда как субкладу 4C1 с входящим типовым изолятом *D. mucoroides* S28b принято считать видом *D. mucoroides* [Romeralo et al., 2010]. Полученные результаты в очередной раз обращают внимание на необходимость пересмотра таксономического положения как группы в целом, так и отдельных изолятов, а также на необходимость систематизации организмов с опорой прежде всего на генетические свойства организмов, а не на их морфологию. На возможную роль диктиостелид в участии в механизме сохранения возбудителя чумы указывают повсеместное распространение *Dictyostelium spp.* в почвах на территории земного шара, а также факты сохранения патогенных бактерий *L. pneumophila*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *Y. pestis* в клетках амёб этого рода [Swanson et al., 1999; Pukatzki et al., 2002; Pukatzki et al., 2006; Jia et al., 2009; Peracino et al., 2010; Markman et al., 2018].

Таким образом, путем анализа нуклеотидных последовательностей генов рРНК определена систематическая принадлежность простейших, выделенных из почв нор грызунов с эпизоотически активных территорий Горно-Алтайского высокогорного очага, к *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. Полученные данные пополняют знания о составе простейших и доминирующих видах отдельных почвенных биоценозов природных очагов чумы. Ввиду своей высокой численности, широкого распространения в различных географических регионах и фактов взаимодействий с патогенными бактериями, в том числе и с *Y. pestis*, выделенные простейшие могут рассматриваться в качестве потенциальных резервуаров возбудителя чумы в почвенной фазе. Для подтверждения этого предположения и изучения особенностей взаимодействий с возбудителем чумы в дальнейших экспериментах использовали изолят *A. castellanii* 13А, выделенный на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

4.2 Моделирование долговременного сохранения в акантамебах *Y. pestis* с использованием флуоресцентного штамма 4.ANT с плазмидой pTurboGFP-B и анализ динамики взаимодействия штамма возбудителя чумы и акантамеб

Для установления возможности использования клеток амёб возбудителем чумы в качестве защитной и репликативной ниш и выяснения закономерностей взаимодействия этих организмов наиболее перспективным является использование объектов, адаптированных к одним и тем же факторам окружающей среды. С этой целью для постановки эксперимента использованы штамм *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* 13A, исходно выделенные на одном участке Горно-Алтайского природного очага чумы (Рисунок 4.5).



Синим цветом отмечено место выделения *A. castellanii* 13A, красным – *Y. pestis* 216 (исходный штамм, использованный для получения флуоресцентного *Y. pestis* KM2083)

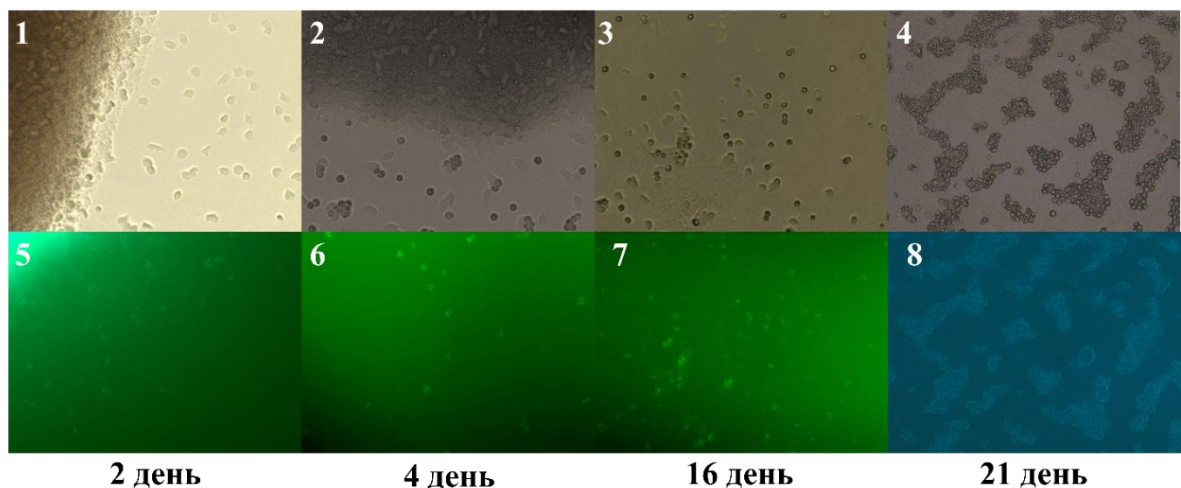
Рисунок 4.5 – Места выделения *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* 13A на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

Культивирование образцов в климатической камере (температура 22 °С, влажность 60 %) позволило приблизиться к оптимальным климатическим условиям окружающей среды. В качестве среды для культивирования использовали солевой буфер АВ с 50 ед/мл ампициллина для поддержания сохранения рекомбинантной плазмиды внутри клеток возбудителя чумы. Буфер АВ используется для сохранения амёб и содержит неорганические соли магния, натрия, калия, железа, однако в нем отсутствуют необходимые для выживания и размножения *Y. pestis* органические вещества, в том числе аминокислоты фенилаланил, треонин и метионин, без которых, как показано в предыдущей главе, рост возбудителя чумы невозможен. Эта среда не способна обеспечить сохранение *Y. pestis* в течение длительного времени. Отсутствие дополнительных органических веществ в среде было

необходимым условием интенсификации фагоцитоза клеток *Y. pestis* амебами и использования клеток *A. castellanii* возбудителем чумы в качестве ресурсной базы, репликативной и защитной ниш.

Штамм *Y. pestis* KM2083 высевали на чашку Петри с агаром LB и инкубировали при 28 °С в течение суток, после чего делали взвесь в концентрации 1×10^9 КОЕ/мл в солевом буфере АВ. Отмытые от питательной среды РУГ трофозоиты *A. castellanii* 13А в концентрации 1×10^6 клеток/мл в отдельных пробирках объединяли со взвесью штамма *Y. pestis* KM2083 до получения определенных соотношений с клетками амеб. Затем образцы культивировали при температуре 22 °С и влажности 60 % и высевали 100 мкл сокультуры исходного образца и в разведениях в 10 и 100 раз на питательную твердую среду LB.

Изучение особенностей взаимодействия *Y. pestis* и *A. castellanii* на твердой питательной среде. Для этого эксперимента использовали сокультуру флуоресцентного *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* 13А в соотношении 0,1 КОЕ/клетка амебы. Образец инкубировали в климатической камере при 22 °С и 60 % влажности в течение 24 ч, после чего 100 мкл образца высевали на чашки Петри с агаром LB в трех повторах и оставляли при тех же параметрах. Просмотр чашек осуществляли на 2, 4, 16 и 21 сутки с момента посева, снимки представлены на Рисунке 4.6.

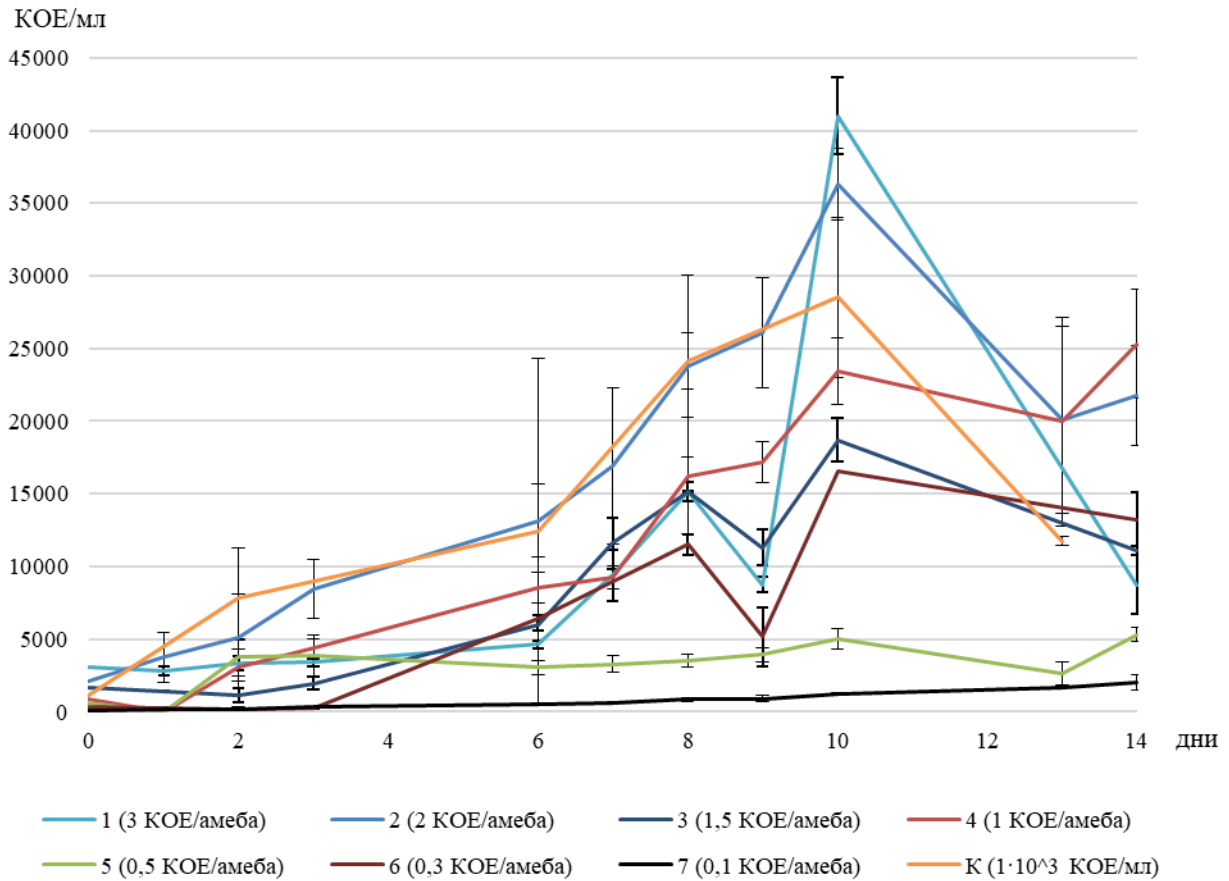


Фотографии 1–4 получены методом световой микроскопии, 5–8 – флуоресцентной с применением светофильтра при длине волны эмиссии – 502 нм. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Увеличение 100х

Рисунок 4.6 – Сокультура *A. castellanii* 13А и *Y. pestis* KM2083 на плотной агаровой среде LB на 2, 4, 16 и 21 дни эксперимента

На 2 сутки эксперимента вокруг бактериальных колоний наблюдали скопления трофозоитов амёб, наполненных клетками *Y. pestis*. Вероятно, расположение клеток продиктовано положительным таксисом по отношению к колониям возбудителя чумы. На 4 сутки наблюдения зафиксировано инцистирование части клеток *A. castellanii*, продолжавшееся вплоть до конца эксперимента. Ранее установлено, что при культивировании *Y. pestis* на твердой питательной среде с амёбами *H. rhyodes* амёбы переходили в неактивное состояние на 2–3 день эксперимента [Никульшин и др., 1992], а при сокультивировании *Y. pestis* с *A. castellanii* в жидкой питательной среде PYG инцистирование клеток амёб наблюдали на 3–4 день, что совпадает с результатами эксперимента [Оглодин и др., 2017]. На 16 день наблюдения на питательной среде часть популяции клеток еще представлена активными формами, причем при сравнении фотографий одного поля наблюдения в разных спектрах (Рисунок 4.6, 3 и 7) флуоресценция клеток *Y. pestis* присутствует как в трофозоидах, так и в цистах. На 21 сутки эксперимента вся популяция акантамёб состояла из групп цист, оболочки которых флуоресцировали в зеленом спектре. Кроме того, установлен факт формирования на питательной среде вторичных колоний *Y. pestis*, вероятно связанный с передвижением амёб по поверхности агара с последующим разрушением оболочек и выходом клеток возбудителя чумы.

Выявление закономерностей взаимоотношений *Y. pestis* и *A. castellanii* на протяжении 14 дней в жидкой минимальной среде. Для установления закономерностей взаимодействия культур на протяжении 14 дней были использованы соотношения *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* A13 – 3 КОЕ/амёба, 2 КОЕ/амёба, 1,5 КОЕ/амёба, 1 КОЕ/амёба, 0,5 КОЕ/амёба, 0,3 КОЕ/амёба, 0,1 КОЕ/амёба. Контрольным образцом являлась взвесь штамма *Y. pestis* KM2083 в концентрации 1×10^3 КОЕ/мл в буфере АВ без добавления клеток акантамёб. Образцы культивировали в климатической камере в постоянных условиях температуры и влажности. В течение эксперимента концентрацию *Y. pestis* KM2083 в образцах определяли ежедневно высевам на агар LB в исходной концентрации и в 10–100 кратных разведениях в буфере АВ. Результаты изменения концентраций *Y. pestis* KM2083 представлены в таблице 4.2 и на рисунке 4.7.



Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей,
уровень значимости $\alpha=0,05$

Рисунок 4.7 – Изменения концентрации *Y. pestis* KM2083 в сокультуре с *A. castellanii* 13A на протяжении 14 дней

Таблица 4.2 – Изменение концентрации *Y. pestis* KM2083 в сокультуре с *A. castellanii* 13A на протяжении 22 месяцев эксперимента

Дни (месяцы)	Концентрация КОЕ <i>Y. pestis</i> KM2083 в образцах			
	№ 1 (3 КОЕ/амеба)	№ 2 (2 КОЕ/амеба)	№ 3 (1,5 КОЕ/амеба)	№ 4 (1 КОЕ/амеба)
1	2	3	4	5
1	2800±277,2	3760±1711	1410±27,7	1237,5±239,1
2	3340±508,3	5140±2993,5	1150±485,1	3050±1870,9
3	3400±277,2	8447±2000,9	1967,5±441,1	4387,5±647,3
6	4630±249,5	13135±2500,7	5940±360,3	8522,5±1071,2
7	9390±1787,8	16885±5366	11580±1746,2	9260,5±797,9
8	15150±69,3	23780±6236,9	15150±623,6	16212,5±4012,5
9	8750±539,3	26100±3789,7	11300±1247,3	17175±1421,8
10	41000±2633,2	36325±2452,3	18700±1524,5	23450±2271,5
13	–	20100±6452,6	–	19975±7187,1
14	8750±2009,6	21750±3442,7	11100±277,2	25325±3732,5

Продолжение Таблицы 4.2

1	2	3	4	5
21	–	2325±1311,8	–	35000±13078,9
28 (1 месяц)	–	5675±1467,3	–	103650±25822,2
61 (2 месяца)	–	4175±2471,8	–	2333±333,1
120 (4 месяца)	–	1480±266,5	–	5100±977,8
150 (5 месяцев)	–	0	–	11740±2024,8
181 (6 месяцев)	–	0	–	2120±337,2
206 (7 месяцев)	–	0	–	20±2
20 месяцев	790±291	0	140±83,1	0
22 месяца	45±7	0	225±48,5	0
Дни (месяцы)	Концентрация КОЕ <i>Y. pestis</i> KM2083 в образцах			
	№ 5 (0,5 КОЕ/амеба)	№ 6 (0,3 КОЕ/амеба)	№ 7 (0,1 КОЕ/амеба)	К (1·10 ³ КОЕ/мл)
1	517,5±140,7	280±27,7	155±20,8	–
2	3770±1281,9	165±34,6	195±103,9	7800±3506,3
3	3830±1483,4	245±20,8	340±41,6	–
6	3045±495,1	6465±159,4	480±41,6	12450±11849,5
7	3277,5±597	–	625±48,5	–
8	3542,5±437,3	11500±692,9	865±131,7	24100±1940,3
9	3935±467,2	5160±2009,5	905±242,5	–
10	4982,5±701,8	16550±720,3	1245±34,6	28500±5544
13	2663,3±791	–	1705±34,6	11750±346
14	5297,5±505,7	13250±1870,9	2010±512,8	–
21	8150±2008,9	–	13620±582	450±207,9
28 (1 месяц)	12533±384,7	–	41833±2544	850±277,2
61 (2 месяца)	1925±800,3	–	8450±4696	105±20,8
120 (4 месяца)	0	–	6600±867	0
150 (5 месяцев)	0	–	24733±9293	0
181 (6 месяцев)	0	–	3590±718	0
206 (7 месяцев)	0	–	80±16	0
20 месяцев	0	90±13,8	120±28	0
22 месяца	0	225±50,5	540±28	0

Примечание: не проводили высевы из сокультур (–), рост колоний *Y. pestis* KM2083 отсутствовал (0)

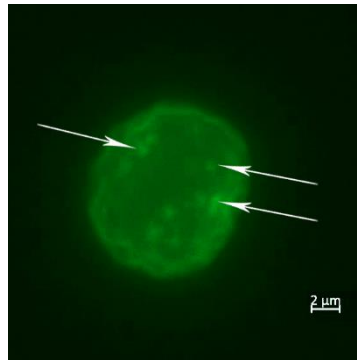
На протяжении первых двух недель резкие колебания концентраций позволили выявить общие закономерности изменений концентраций. До 8 дня во всех образцах происходит постепенное накопление биомассы бактерий, после чего отмечаются колебания концентрации, вероятно связанные с влиянием акантамеб на популяцию возбудителя чумы. На 9 сутки в образцах происходит замедление скорости роста концентрации, у ряда образцов (3 КОЕ/амеба, 1,5 КОЕ/амеба, 0,3 КОЕ/амеба) в этой точке наблюдается падение концентрации *Y. pestis* KM2083. На следующие сутки было зафиксировано увеличение концентрации возбудителя чумы во всех экспериментальных образцах до максимальных значений (Таблица 4.2, Рисунок 4.7), после чего значения концентраций сокращаются до предыдущего уровня. Повышение концентрации бактериальных клеток на 8 сутки могло повлечь за собой размножение амёб и интенсификацию фагоцитоза.

В контрольном образце на протяжении первых дней эксперимента наблюдался рост концентрации клеток *Y. pestis*, результатом которого стало достижение максимального значения концентрации на 10 сутки. Можно предположить, что такая высокая скорость размножения в контрольном образце поддерживалась за счет накопленных в клетках питательных веществ. Однако в последующие дни эксперимента концентрация *Y. pestis* начала снижаться, в отличие от образцов с соотношениями концентраций 2 КОЕ/амеба, 1 КОЕ/амеба, 0,5 КОЕ/амеба, у которых на 13 день измерения наблюдался повышение концентрации. При изучении взаимодействий *Y. pestis* с *A. castellanii* в жидкой питательной среде LB концентрация клеток *Y. pestis* контрольного образца, в котором клетки акантамеб отсутствовали, достигла максимального значения на 4 сутки и на протяжении последующих 10 суток культивирования оставалась на стадии плато, тогда как в образцах с амёбами по достижению максимальных концентраций на 5-е сутки наблюдали колебания концентраций до 14 дня сокультивирования [Оглодин и др., 2017].

Выявление закономерностей взаимоотношений *Y. pestis* и *A. castellanii* при длительном сокультивировании в жидкой минимальной среде. Для установления закономерностей более длительного существования возбудителя чумы в сокультуре с амёбами экспериментальные образцы в соотношениях концентраций *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* A13 2 КОЕ/амеба, 1 КОЕ/амеба, 0,5 КОЕ/амеба, 0,1 КОЕ/амеба продолжали высевать далее. В течение двух последующих недель (3–4 недели сокультивирования) образцы высевали 1 раз в неделю, а в дальнейшем определение концентраций проводили ежемесячно на протяжении 7 месяцев, а затем через 20 и 22 месяца с начала эксперимента.

Образцы с соотношениями концентраций *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* A13 3 КОЕ/амеба, 1,5 КОЕ/амеба, 0,3 КОЕ/амеба высевали на протяжении первых двух недель эксперимента, и затем через 20 и 22 месяца с начала эксперимента. В качестве контрольного образца использовали взвесь штамма *Y. pestis* KM2083 в концентрации 1×10^3 КОЕ/мл в буфере АВ без добавления клеток акантамеб.

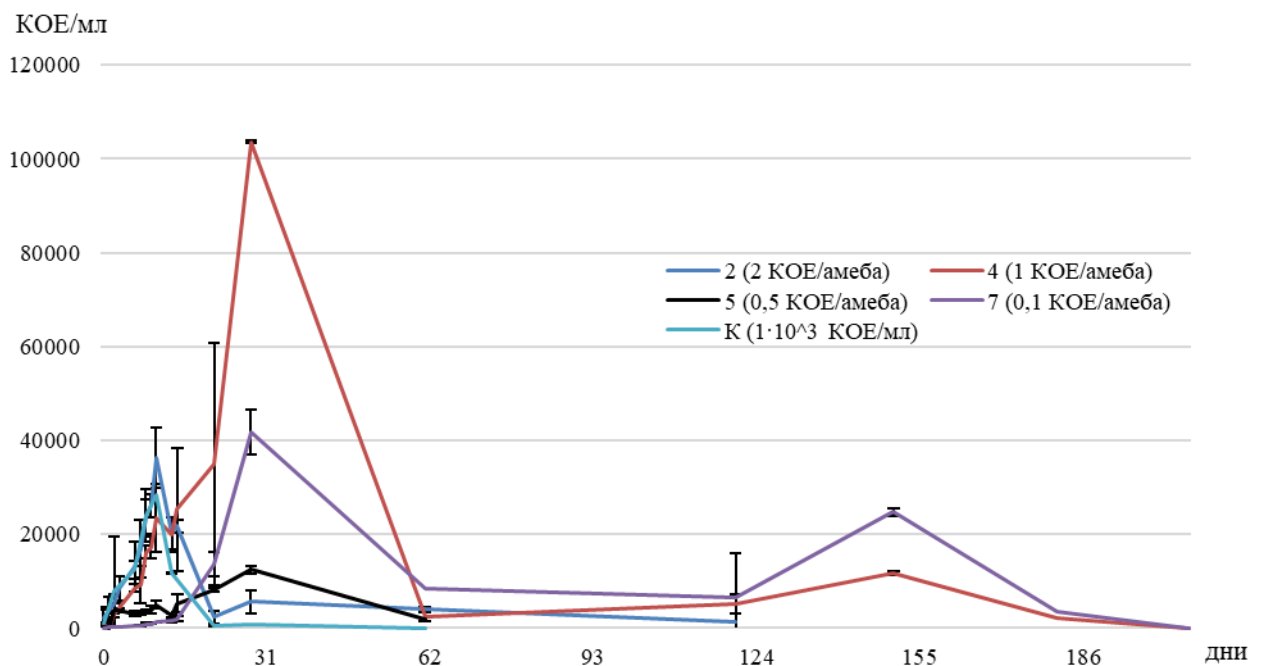
По результатам эксперимента длительностью 22 месяца установлено, что в сокультуре с амебами *A. castellanii* 13А жизнеспособные клетки возбудителя чумы сохраняются на протяжении гораздо более длительного периода времени, чем в образцах без акантамеб. Так, к концу эксперимента через 22 месяца жизнеспособные клетки *Y. pestis* KM2083 сохранились в образцах с концентрациями 3 КОЕ/амеба, 1,5 КОЕ/амеба, 0,3 КОЕ/амеба, 0,1 КОЕ/амеба. Клетки возбудителя чумы были локализованы внутри клеток цист акантамеб (Рисунок 4.8). Образец с концентрацией 1 КОЕ/амеба сохранился в течение 7 месяцев, образец с концентрацией 2 КОЕ/амеба – 4 месяцев, образец с концентрацией 0,5 КОЕ/амеба – 2 месяцев (перестав высеваться одновременно с контрольным образцом).



Стрелками показаны клетки *Y. pestis* внутри цисты амебы. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Светофильтр с длиной волны эмиссии 502 нм, увеличение 1500х
Рисунок 4.8 – Фотография цисты *A. castellanii* 13А после 22 месяцев сокультивирования с находящимися внутри клетками *Y. pestis* KM2083

Результаты анализа динамики концентраций *Y. pestis* KM2083 в образцах указывает на ее «циклический» характер, обусловленный чередованием фаз подъема и падения (Рисунок 4.9). Наблюдаемые повышения концентрации *Y. pestis* в экспериментальных образцах в отсутствие органических веществ свидетельствуют о влиянии акантамеб на популяцию возбудителя чумы и доказывают их роль в сохранении *Y. pestis*. Через месяц совместного культивирования во всех экспериментальных образцах наблюдали повышение

концентрации *Y. pestis*, значительно превышавшее предыдущее значение (Таблица 4.2, Рисунок 4.9). Кроме того, в образцах с концентрациями 1 КОЕ/амеба и 0,1 КОЕ/амеба, высевавшихся дольше остальных, на 5 месяц сокультивирования также наблюдали резкое повышение численности *Y. pestis*. Можно предположить, что увеличение концентрации бактериальных клеток являлось следствием размножения клеток *Y. pestis* в амебах и их выходом во внешнюю среду, тогда как сокращение численности *Y. pestis* происходило в результате последующего размножения амеб, роста фагоцитирующей активности амеб и гибели свободных бактериальных клеток в отсутствие питательных веществ.



Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей,
уровень значимости $\alpha=0,05$

Рисунок 4.9 – Изменение концентрации *Y. pestis* KM2083 в сокультуре с *A. castellanii* 13А на протяжении 7 месяцев

Анализ изменения концентраций клеток *Y. pestis* в контрольном образце доказывает, что после достижения максимальной концентрации на 10 сутки численность бактериальных клеток начала сокращаться в отсутствие колебаний их численности. Вероятно, после исчерпания накопленных в клетках питательных веществ популяция возбудителя чумы не могла поддерживать такие высокие темпы роста, следствием чего стало стремительное сокращение ее численности.

Таким образом, по результатам наблюдения за сокультурой *Y. pestis* и *A. castellanii*, инкубируемой на твердой питательной среде, установлен положительный таксис клеток акантамеб по отношению к бактериальным колониям, что является необходимым условием взаимодействия между популяциями организмов. Выявлен временной отрезок перехода клеток *A. castellanii* в неактивное состояние на твердой питательной среде, начало которого совпадает с ранее проводимыми экспериментами, а инцистирование всей популяции происходит между 16 и 21 днями. Также формирование на питательной среде вторичных колоний возбудителя чумы, изначально лишённого подвижности, наглядно демонстрирует участие клеток простейших в переносе культур *Y. pestis*.

Моделирование ситуации, в которой единственным возможным сценарием для выживания *Y. pestis* в окружающей среде в отсутствие необходимых органических веществ и аминокислот было использование простейших, а также использование организмов, выделенных с территорий одного биоценоза, позволило создать наиболее приближенные к природным условия для взаимодействия двух культур. Отмечены колебания концентраций *Y. pestis* с 8 суток и продолжавшиеся до конца двухнедельного срока эксперимента. Можно предположить, что выявленные колебания концентрации на 8 день отражают момент начала взаимодействий двух культур. Кроме того, при длительном сокультивировании *Y. pestis* и *A. castellanii* через 1 и 5 месяцев были отмечены резкие повышения концентраций *Y. pestis*, свидетельствующие о размножении возбудителя за счет питательных ресурсов, предоставляемых амебами. По окончании времени эксперимента через 22 месяца от начала сокультивирования в 4 из 7 экспериментальных образцах с различными соотношениями концентраций *Y. pestis* и *A. castellanii* установлено присутствие жизнеспособных клеток возбудителя чумы, что доказывает возможность сохранения *Y. pestis* в ассоциации с клетками акантамеб в почвах природных очагов чумы.

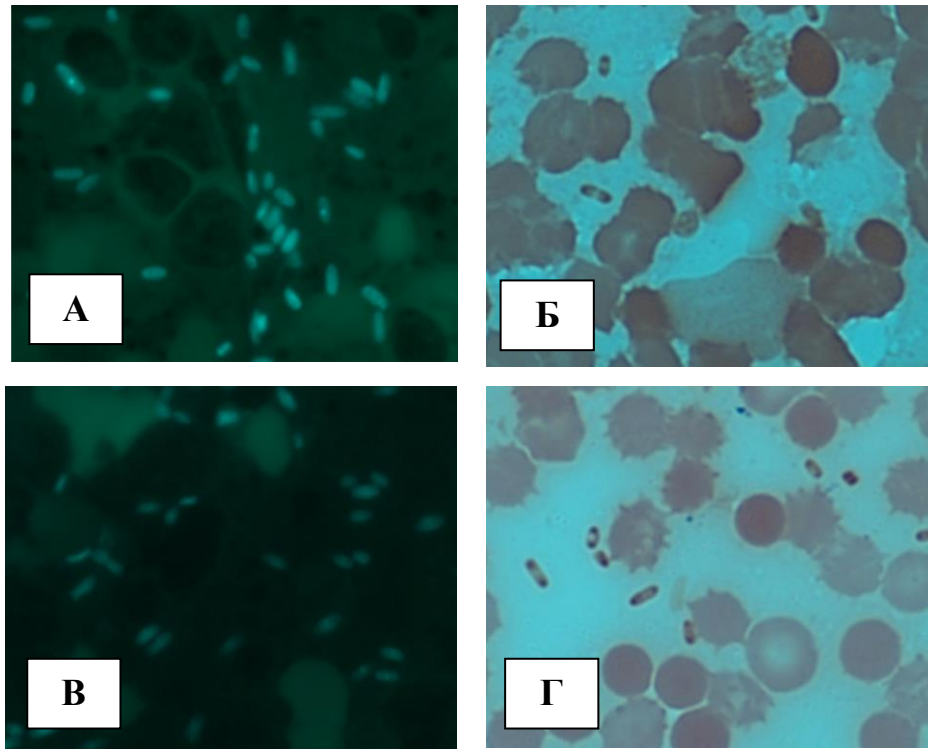
4.3 Влияние длительного сосуществования *Y. pestis* и акантамеб на сохранение фенотипических, генетических и вирулентных свойств клеток *Y. pestis*

Для оценки влияния длительного совместного культивирования в среде с *A. castellanii* без дополнительных питательных веществ на свойства возбудителя чумы проведен сравнительный анализ свойств штамма *Y. pestis* KM2083 до и после сокультивирования. В процессе изучения культурально-морфологических свойств штамма *Y. pestis* KM2083 после совместного культивирования установлено, что клетки этого штамма представляли собой биполярно-окрашенные грамотрицательные палочки, на плотной питательной среде LB образовывали единичные колонии типичной R-формы, 9 % из которых продуцировали флуоресцентный белок. Образование колоний клеток, не синтезирующих флуоресцентный белок или утративших плазмиду pTurboGFP-B, может быть следствием деградации в среде антибиотика ампициллина, способствовавшего отбору бактериальных клеток с рекомбинантной плазмидой. Для дальнейшего анализа свойств были отобраны производные штамма *Y. pestis* KM2083 как сохранившие, так и утратившие свойство флуоресценции.

Анализ биохимических свойств не выявил отличий между исследованными культурами штамма *Y. pestis* KM2083. Все три варианта (исходный штамм *Y. pestis* KM2083, а также продуцирующий и не продуцирующий флуоресцентный белок TurboGFP производные этого штамма после сокультивирования с амебами) обладали свойством денитрификации, ферментации глюкозы, арабинозы, маннозы, орто-нитрофенил- β -галактозидарабинозы, глицерина, при отсутствии ферментации рамнозы, мелибиозы, лактозы, сахарозы, сорбита, инозита, мочевины. Зависимость роста производных штамма *Y. pestis* KM2083 от присутствия в среде фенилаланина, метионина и треонина не изменилась.

Сохранение основных детерминант вирулентности (плазмида кальций-зависимости и хромосомная *pgm*-область пигментации) в полученных культурах штамма *Y. pestis* KM2083 было подтверждено отсутствием роста на среде Хигучи при 37 °C и сорбцией колониями пигмента (Конго красный) из плотной питательной среды. Вирулентность исходного штамма *Y. pestis* KM2083 и его производных после сокультивирования (продуцирующие и не продуцирующие флуоресцентный белок TurboGFP) оценивали также *in vivo* подкожным заражением беспородных белых мышей в дозах 1×10^3 КОЕ/мл и 1×10^4

КОЕ/мл. Выявлено, что все культуры вызывали гибель лабораторных животных в использованных дозах, при вскрытии наблюдали типичную патологическую картину, в мазках из органов животных присутствовали клетки возбудителя чумы. На рисунке 4.10 представлены изображения мазков-отпечатков внутренних органов животных с клетками культур *Y. pestis* после сокультивирования с амебами, продуцирующей (Рисунок 4.10, А и В) и не продуцирующей флуоресцентный белок TurboGFP (Рисунок 4.10, Б и Г).



А – *Y. pestis* KM2083 (с белком TurboGFP) в селезенке при длине волны эмиссии 502 нм;

Б – *Y. pestis* KM2083 (без белка TurboGFP) в легких, окрашивание по Грамму;

В – *Y. pestis* KM2083 (с белком TurboGFP) в печени при длине волны эмиссии 502 нм;

Г – *Y. pestis* KM2083 (без белка TurboGFP) в крови, окрашивание по Граму.

Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, ФРГ), увеличение 1500х

Рисунок 4.10 – Клетки *Y. pestis* KM2083 в мазках-отпечатках органов павших животных

Влияние сокультивирования с *A. castellanii* в течение 22 месяцев на плазмидный состав *Y. pestis* (pCad, pFra, pPst) оценивали методом ПЦР с помощью тест-системы «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ» (регистрационное удостоверение ФСР 2011/12105) и методом С. Kado и S.T. Liu [Kado, Liu, 1981]. У клеток одной колонии (0,9 % от исследованных) была утрачена плазида pPst, что может быть связано с нахождением *Y. pestis* в

жестких условиях культивирования в течение эксперимента. Также у исследованных культур штамма было установлено сохранение плазмиды pTP33, характерной для филогенетической линии 4.ANT. По результатам исследований культур штамма *Y. pestis* KM2083 в соответствии с низкой частотой утраты плазмиды pPst можно констатировать отсутствие значимого влияния совместного культивирования с амебами на плазмидный состав возбудителя чумы.

Для определения влияния длительного сосуществования с амебами на нуклеотидную последовательность хромосомы возбудителя чумы выполнено полногеномное секвенирование двух вариантов штамма *Y. pestis* KM2083 (продуцирующий и не продуцирующий флуоресцентный белок) после совместного культивирования с *A. castellanii*. В результате сравнения полученных последовательностей с сиквенсом исходного штамма обнаружены 4 общие SNPs, характерные для обоих вариантов после сокультивирования, среди которых две несинонимичны (Таблица 4.3). Помимо общих SNPs, в хромосомной последовательности не продуцирующего белок TurboGFP штамма *Y. pestis* присутствовали еще 5 SNPs (две несинонимичные, одна приводит к стоп-кодону, две в межгенном пространстве). Выявленные мутации не затронули гены, определяющие основные свойства возбудителя чумы.

Таким образом, в результате сравнения исходного варианта и производных штамма *Y. pestis* KM2083 установлено отсутствие влияния длительного совместного культивирования с *A. castellanii* 13A на морфологические, биохимические свойства, вирулентность и генетические детерминанты вирулентности возбудителя чумы. Это может свидетельствовать о способности акантамеб выступать в качестве защитных и репликативных ниш возбудителя без влияния на основные факторы вирулентности *Y. pestis* в почве природных очагов чумы.

Таблица 4.3 – Выявленные нуклеотидные полиморфизмы производных штамма *Y. pestis* KM2083 после культивирования в течение 22 месяцев с *A. castellanii* 13A

Вариант штамма	Ген	Кодируемый продукт	Мутация, координаты по геному <i>Y. pestis</i> CO92 (ID NCBI GenBank: NC_003143.1)
1, 2*	YPO_RS10010	Белок Р-кольца базального тельца жгутика	C→A, 2050377, Arg→Ser
1, 2	YPO_RS10405	Белок, содержащий домен рецептора toll/интерлейкина-1	G→T, 2124310, Lys→Asn
1, 2	<i>tssF</i>	Субъединица базовой пластинки системы секреции VI типа TssF	G→C, 1686038, синонимичная
1, 2	Межгенная область	–	A→G, 2125597, синонимичная
2	YPO_RS10640	Белок, содержащий карбоксипептидазоподобный регуляторный домен	A→T, 2187586, Tyr→Phe
2	YPO_RS15035	Фосфатаза PAP2 / белок семейства фосфатаз двойной специфичности	T→A, 3144064, Ile→Lys
2	YPO_RS04100	Пиридоксальфосфат-зависимая аминотрансфераза	C→A, 684581, Ser→стоп-кодон
2	Межгенная область	–	AT→TA, 1094928–1094929, синонимичная
2	Межгенная область	–	AT→TA, 4626509–4626510, синонимичная

Примечание: *1 – производный *Y. pestis* KM2083, продуцирующий TurboGFP, 2 – производный *Y. pestis* KM2083, не продуцирующий TurboGFP.

По результатам исследований в главе 4 в почвах на эпизоотически активных участках Горно-Алтайского высокогорного очага установлено присутствие простейших *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. В соответствии с широким географическим распространением, высокой численностью этих амёб в почвах, а также известными фактами взаимодействий с патогенными микроорганизмами, можно предположить их роль в жизненном цикле и сохранении возбудителя чумы в природных очагах чумы. По результатам наблюдения за сокультурой *Y. pestis* и *A. castellanii*, инкубируемой на плотной питательной среде, установлен положительный таксис клеток акантамеб по отношению к бактериальным колониям и формирование на питательной среде вторичных колоний возбудителя чумы, что указывает на наличие взаимодействий между двумя культурами. Сокультивирование *Y. pestis* и *A. castellanii* в жидкой среде в отсутствие питательных веществ, в том числе необходимых для роста возбудителя чумы аминокислот фенилаланина, метионина и треонина, позволило установить значительно более длительный срок сохранения жизнеспособных клеток возбудителя чумы до 22 месяцев по сравнению с контрольными образцами. Следует отметить, что при длительном сокультивировании *Y. pestis* и *A. castellanii* в жидкой среде на протяжении 7 месяцев при подсчете клеток акантамеб в образцах помимо неактивных форм, присутствовали амёбоидные трофозоиты, способные вступать во взаимодействия с клетками возбудителя чумы. Также установлено, что длительное сокультивирование организмов не привело к изменению основных свойств *Y. pestis* и вирулентности, что является важным аргументом в пользу рассмотрения акантамеб в качестве защитных и репликативных ниш, поддерживающих потенциально вирулентный пул клеток *Y. pestis* в почве природных очагов чумы.

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *Y. pestis* С НЕМАТОДАМИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ НЕМАТОД ИЗ ГОРНОГО АЛТАЯ И ТУВЫ

Одной из наиболее широко представленных групп организмов почвенного биоценоза, наряду с простейшими, являются нематоды. Показано, что возбудитель чумы способен образовывать на кутикуле нематод биопленку, которая блокирует питание и приводит к их гибели [Darbi et al., 2002]. Также опубликованы данные о несвязанном с биопленкообразованием механизме гибели нематод под воздействием токсических веществ, выделяемых *Y. pestis* в полость нематод [Styer et al., 2005]. Дальнейшее развитие это направление исследований получило после выявления полигостальных паразитических нематод *Rubzovinema spp.*, поражающих блох, основных векторов передачи *Y. pestis* [Ерошенко и др., 2016; Оглодин и др., 2018; Koshel et al., 2014]. Совокупность накопленных данных привела к разработке гипотезы вертикальной трансмиссии возбудителя чумы, согласно которой личинки паразитических нематод, инфицированные возбудителем чумы, заражают личинки блох, тем самым способствуя дальнейшему выносу *Y. pestis* из почвенного в наземный биоценоз [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011]. В связи с этим актуальным является изучение представителей нематод эпизоотически активных территорий природных очагов чумы, исследование взаимодействий с ними *Y. pestis*, а также определение микробного окружения паразитических нематод, с которым клетки возбудителя чумы могут гипотетически взаимодействовать на протяжении своего жизненного цикла.

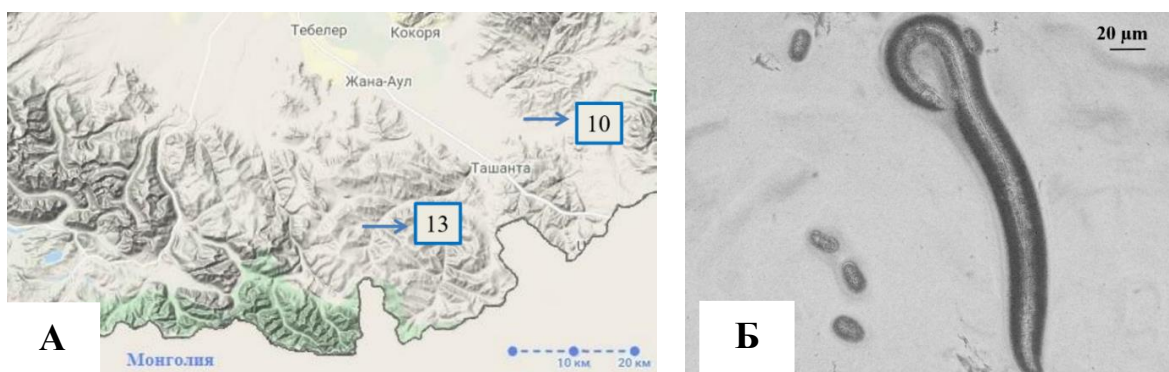
5.1 Анализ взаимодействия *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенными нематодами из природного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

Почвенные нематоды являются одними из массовых членов почвенного биоценоза, достигая численности порядка 10^7 на 1 м^2 [Back et al., 2002]. Свободноживущие нематоды оказывают значительное влияние на почвенный биоценоз, принимая активное участие в деструкции органических останков и являясь основным регулятором численности бакте-

риальных популяций. Во время эпизоотий вероятность контакта нематод с клетками возбудителем чумы увеличивается за счет попадания инфицированных останков животных, блох и продуктов их жизнедеятельности в почвенный биоценоз и включения их в детритные пищевые цепи. В связи с этим возрастает актуальность изучения видового состава нематод природных очагов чумы и их взаимоотношений с *Y. pestis*. Целесообразным является изучение отношений организмов, выделенных из одного природного биоценоза активного в настоящее время Горно-Алтайского природного очага чумы.

5.1.1 Определение систематической принадлежности почвенных нематод из нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

Оценку видового разнообразия свободноживущих нематод почв нор грызунов Горно-Алтайского природного очага чумы проводили с использованием проб, собранных в 2016 г. Места и процесс сбора проб описан в подглаве 4.1 главы 4. Навеску почвы (1 г) помещали на газон *E. coli* OP50 на агаре NGM, увлажняли физраствором и инкубировали в климатической камере при 22 °С и влажности 60 %. При выходе нематод на поверхность агара отдельных особей из каждой точки сбора образцов пересаживали на новые чашки Петри с газоном кишечной палочки. В целях избавления от сопутствующей микрофлоры нематод последовательно пересаживали на чашки Петри с агаром NGM либо отмывали яйца нематод в растворе глутарового альдегида [Brenner, 1974]. Из двух почвенных образцов под номерами 10 и 13 были выделены нематоды, впоследствии обозначенные по месту выделения 10Н и 13Н соответственно (Рисунок 5.1).



А – Места выделения нематод из проб почв, Б – половозрелая особь нематоды 13Н с яйцами, микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 100х

Рисунок 5.1 – Почвенные нематоды, выделенные из почв Горно-Алтайского природного очага чумы

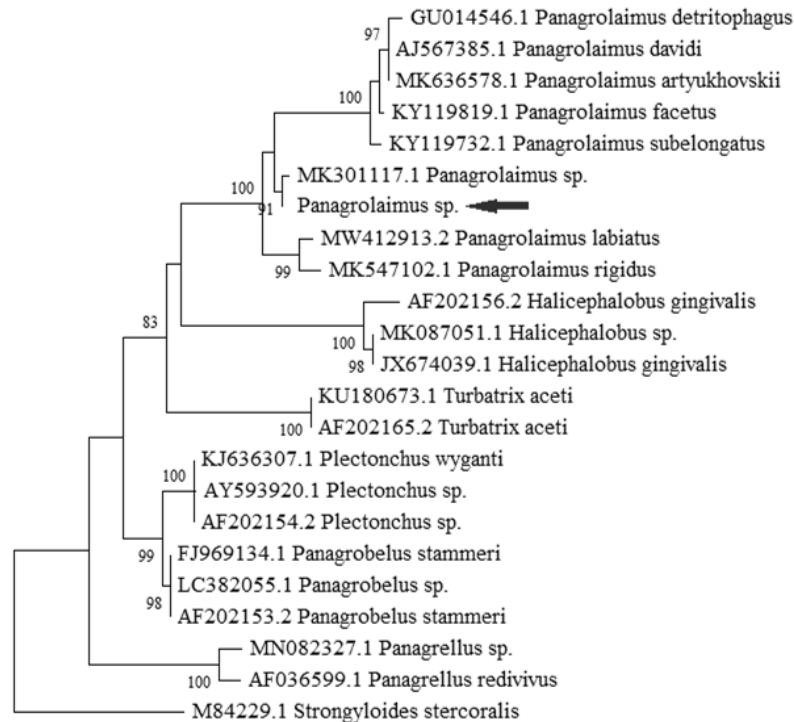
Для выделения ДНК нематод использовали комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-Д» (Ампли-Сенс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для получения генетического материала 10 взрослых особей нематод помещали в пробирку с физраствором. Установление систематической принадлежности нематод осуществляли при анализе фрагментов нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК малой субъединицы рибосомы, полученных методом ПЦР со специфичными праймерами SSU18A (5'AAAGATTAAGCCATGCATG3') и SSU26 (5'CATTCCTTGGCAAATGCTTTCG3') [Blaxter et al., 1998].

Сравнение полученной нуклеотидной последовательности образца 13Н размером 922 п.н. с депонированными последовательностями в базе данных NCBI GenBank алгоритмом megablast позволило выявить родство нематод, выделенных из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага, с нематодами *Panagrolaimus sp.* 4164 (№ NCBI GenBank MK301117.1) [Holterman et al., 2019] при проценте идентичности 97,79 % и общим покрытием последовательностей 97 %. На основании полученных данных можно сделать вывод о принадлежности исследуемой нематоды к роду *Panagrolaimus*, но для видовой идентификации в используемой базе данных содержится недостаточно информации. Возможно, в международных базах данных отсутствуют нуклеотидные последовательности этого вида либо эти нематоды относятся к ранее не описанному виду.

Для установления систематического положения изучаемой нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага в семействе Panagrolaimidae был проведен филогенетический анализ полученной последовательности гена 18S рРНК образца 13Н. Сформированная выборка данных включала 22 нуклеотидные последовательности представителей этого семейства, в качестве корня использовали последовательность гена малой субъединицы рибосомы нематоды *Strongyloides stercoralis* (№ NCBI GenBank M84229.1.), входящей в инфраотряд Panagrolaimomorpha [Holterman, 2019].

По результатам филогенетического анализа *Panagrolaimus sp.* 13Н из Горно-Алтайского очага чумы располагается в одном общем кластере (100 % бутстреп-поддержка ветви) с другими представителями *Panagrolaimus*, что подтверждает ее принадлежность к этому роду (Рисунок 5.2). По данным литературы известно, что нематод рода *Panagrolaimus* согласно классификации по типу питания относят к избирательным бактерио-детритофагам [Гагарин, 2001], что согласуется с нашими наблюдениями. Кроме того,

представители этого рода распространены в различных типах почв и биоценозов Республики Алтай, в том числе и на природно-очаговой территории, что повышает вероятность встречи этих нематод с клетками возбудителя чумы в почве [Суцук и др., 2022; Oglodin et al., 2019].



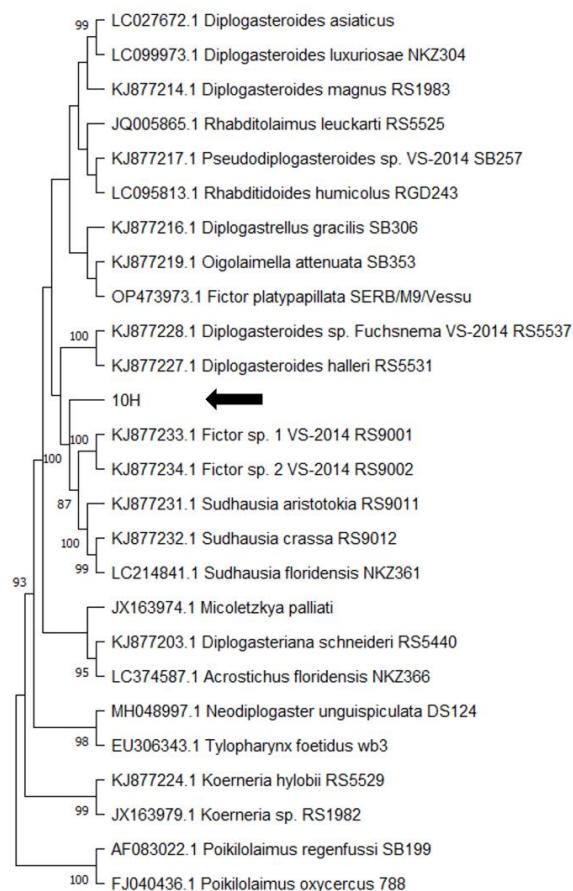
Стрелкой выделена нематода *Panagrolaimus sp.*13Н из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Анализ выполнен в программе Mega 7.0 методом Maximum Likelihood моделью Tamura-Nei. Значения бутстреп-подкрепления ветвей, превышающие 75 %, приведены рядом с ветвями

Рисунок 5.2 – Анализ филогенетических связей нематод рода *Panagrolaimus* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы по последовательности участка гена 18S рРНК

При анализе последовательности участка гена 18S рРНК образца 10Н размером 830 п.н. установлено, что при 99 % равенстве длин нуклеотидных последовательностей базы данных NCBI GenBank наибольший процент идентичности был выявлен с последовательностями *Fictor sp.* (№ NCBI GenBank KJ877233.1) и *Sudhausia aristotokia* (№ NCBI GenBank KJ877231.1), сходство с которыми составляет 83,14 % и 83,16 % соответственно. Выявленный низкий процент идентичности между последовательностями может говорить о принадлежности нематоды из Горного Алтая к ранее не описанному роду или роду,

нуклеотидные последовательности которого не были депонированы в международные базы данных. Для установления более точного систематического положения необходимы более подробное морфологическое изучение нематод и более протяженный участок генов рРНК, в том числе последовательности межгенных спейсеров ITS1 и ITS2.

При построении филогенетического дерева для выборки были использованы 25 последовательностей гена 18S рРНК нематод, относящихся к семейству Diplogasteroidea. В качестве корня были выбраны *Poikilolaimus regenfussi* и *P. oxycercus* семейства Rhabditidae. Результаты филогенетического анализа представлены на Рисунке 5.3.



Стрелкой выделена нематода 10H из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Анализ выполнен в программе Mega 7.0 методом Maximum Likelihood моделью Tamura-Nei. Значения бутстреп-подкрепления ветвей, превышающие 75 %, приведены рядом с ветвями

Рисунок 5.3 – Филогенетический анализ связей нематод семейства Diplogasteroidea из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага чумы по последовательности участка гена 18S рРНК

Филогенетический анализ последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы позволил выявить дивергенцию изолята 10Н из Горно-Алтайского очага чумы от других родов семейства *Diplogasteroidae*, взятых в исследование (Рисунок 5.3). Также в соответствии с результатами анализа гомологии представители родов *Fictor* и *Sudhausia* являются сестринскими кладами (100 % бутстреп-поддержка ветви) в отношении исследуемого изолята 10Н. Следует сказать, что многие представители семейства *Diplogasteroidae* характеризуются способностью вступать в ассоциации с насекомыми. Представители этих родов рассматриваются в качестве нематод, паразитирующих на навозных жуках рода *Onthophagus* (Herrmann et al., 2013; Kanzaki et al., 2017; Mahboob, Tahseen, 2022). Выделение свободноживущих форм нематод *Fictor setosus* и *Fictor denticulatus* с территорий скотных дворов говорит о наличии свободноживущих форм этих видов [Yousuf, Mahamood, 2017]. Выделенная нами нематода из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага свободно развивалась и размножалась на агаре NGM, используя в качестве источника пищи стандартную культуру *E. coli* OP50, но нельзя исключать возможность того, что она также способна вступать во взаимодействие с насекомыми, как и представители родственных ей таксонов.

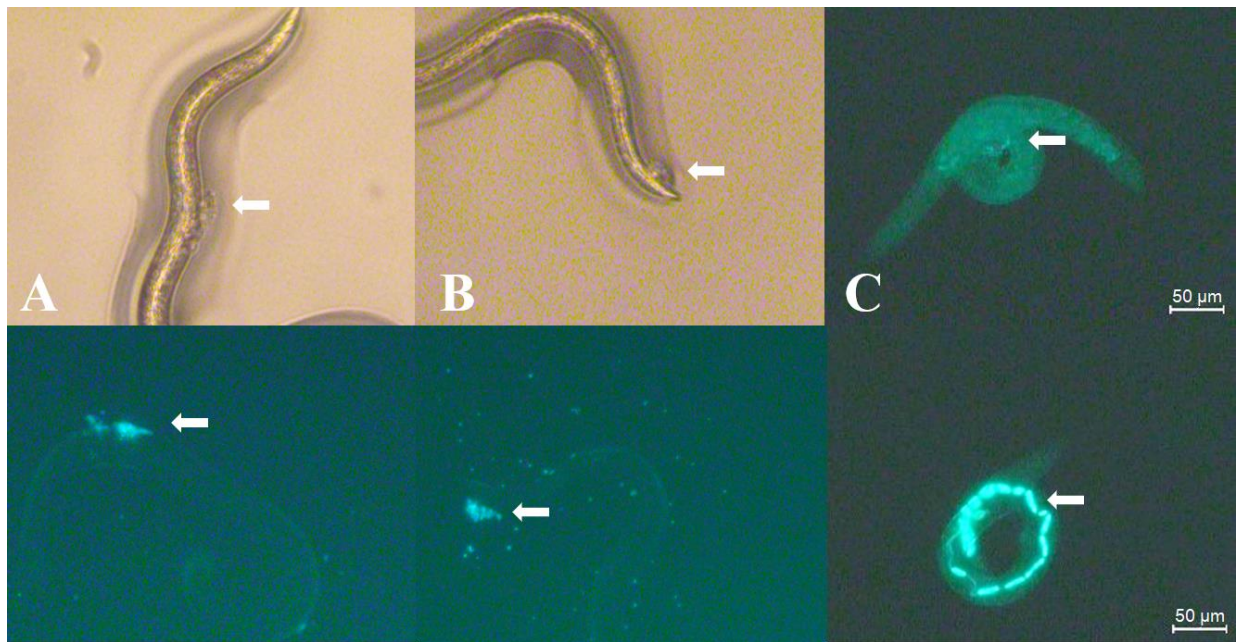
Таким образом, при анализе почвенных биоценозов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы нами были выделены два представителя свободноживущих нематод. На основании анализа нуклеотидных последовательностей рРНК малой субъединицы рибосомы установлена систематическая принадлежность одного изолята к роду *Panagrolaimus*. Систематическую принадлежность другого изолята установить не удалось за неимением соответствующих данных в генетических базах данных, можно говорить только о его принадлежности к семейству *Diplogasteroidae*, однако судя по филогенетическому родству с нематодами-паразитами насекомых представитель этой группы нематод может оказывать определенное влияние на паразитарную систему возбудителя чумы. Возможно, этот изолят выявлен впервые или является представителем неизвестного в настоящий момент таксона. В следующем подразделе будет рассмотрено влияние *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н.

5.1.2 Изучение особенностей биопленкообразования и влияния *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на нематод

Известно, что *Y. pestis* может вызывать гибель нематод при помощи двух различных механизмов: связанного с биопленкообразованием и независящего от этой способности. Согласно первому сценарию, возбудитель чумы образует массивную биопленку на поверхности кутикулы нематод, тем самым иммобилизует нематод и блокирует их питание [Ерошенко и др., 2012; Darby et al., 2002]. Второй механизм был выявлен у штаммов *Y. pestis*, утративших способность к образованию биопленки, и заключался в выделении токсических продуктов в просвет кишечника нематод [Styer et al., 2005]. Следует отметить, что в подавляющем большинстве экспериментов влияние *Y. pestis* изучали на модельном организме *C. elegans*, тогда как особую актуальность имеют выявления особенностей взаимодействий организмов, являющихся членами одного биоценоза. С этой целью в эксперимент были взяты флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083 линии 4.ANT и аксеническая культура нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н, выделенные с одной территории активного в настоящий момент Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Суточные газоны *Y. pestis* KM2083 и *E. coli* OP50 готовили, нанося 0,1 мл взвеси в концентрации 10^9 КОЕ/мл в физрастворе на чашки Петри с твердой агаровой средой NGM и инкубируя их при 22 °С. Культуру нематод предварительно выращивали на среде NGM до стадии L4. Далее на чашки Петри (диаметром 90 мм) с бактериальным газоном *Y. pestis* KM2083 под контролем стереомикроскопа «Stemi-2000C» (Carl Zeiss, Германия) помещали 20 нематод и культивировали в климатической камере в течение суток при той же температуре. По прошествии времени инкубации каждую нематоду перемещали на отдельную чашку Петри (диаметром 55 мм) с газоном *E. coli* OP50 и в течение эксперимента ежедневно оценивали количество живых и павших нематод. Нематода считалась погибшей, если она не реагировала и не проявляла двигательной активности в ответ на раздражающий фактор изменения освещения. При выявлении яиц на бактериальных газонах взрослую нематоду отсаживали на новый газон. В конце эксперимента просмотр чашек Петри в видимом и зеленом спектрах осуществляли под микроскопом Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). За контроль были взяты нематоды, культивированные в течение всего времени эксперимента на газоне *E. coli* OP50. Эксперимент проводили в трех биологических повторностях.

По прошествии 14 дней со дня начала эксперимента на поверхности нематод в области половых органов и хвоста зафиксировано образование биопленки штаммом *Y. pestis* KM2083 (Рисунок 5.4. А, В), не приводившей к иммобилизации нематод. Кроме того, в кишечном тракте *Panagrolaimus sp.* 13Н присутствовало скопление клеток возбудителя чумы (Рисунок 5.4. С).



Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 100х

Рисунок 5.4 – Биопленки флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 в области вульвы (А) и хвоста (В) нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н и скопления клеток возбудителя чумы в кишечном тракте нематоды (С)

Полученные данные о биопленкообразовании исследуемого штамма соотносятся с результатами других исследователей. Так, образование биопленки в области половых органов было обнаружено на кутикуле нематод Tylenchida и Rhabditida из Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского степного и Прикаспийского Северо-Западного степного очагов чумы [Кошель, 2014], опухший и вздутый хвост *C. elegans* наблюдался при инфицировании *Y. pestis* [Styer et al., 2005]. Вероятно, явления опухания хвоста и биопленкообразования в этой области связано с адгезией клеток возбудителя чумы к рецепторам эпикутикулы нематод [Darby et al., 2007]. Любопытным является факт отсутствия в настоящем исследовании зафиксированного образования биопленки в области головы нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н, в то время как в других исследованиях на модели *C. elegans* это

явление рассматривается как универсальное [Ерошенко и др., 2012, Darby et al., 2002]. В отдельных работах именно это явление блокирования головы и ротового отверстия рассматривалось в качестве причины гибели нематод [Darby et al., 2002].

По окончании эксперимента с учетом количества погибших особей проводили расчет выживаемости нематод, культивированных на газонах *Y. pestis* KM2083 в течение суток (Рисунок 5.5). В соответствии с р-уровнем значимости, равным 0,35, сделан вывод об отсутствии различий между контрольным и экспериментальным образцом, подтвержденных статистически. Это может свидетельствовать об отсутствии негативных влияний возбудителя чумы на продолжительность жизни нематод.

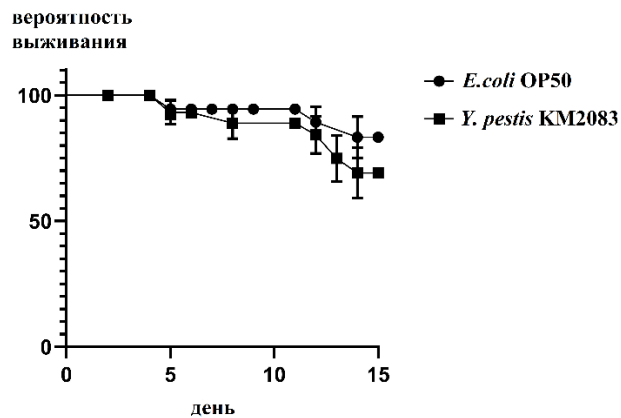


Рисунок 5.5 – Результаты анализа выживаемости нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н на протяжении двух недель, после 24 ч совместного культивирования нематод на газоне *Y. pestis* KM2083 (экспериментальный образец) и на газоне *E. coli* OP50 (контрольный образец), р-уровень = 0,35

Ряд исследователей в целях оценки токсического влияния возбудителя чумы на нематод вне зависимости от биопленкообразования культивировали модельный вид *C. elegans* N2 на газонах штаммов, лишенных оперона *hmsHFRS* [Styer et al., 2005; Bartra et al., 2008]. Согласно этим работам, большинство особей нематод, контактировавших с клетками *Y. pestis* в период времени от 1 до 10 суток, погибало на 7–10 день эксперимента. При культивировании нематод *C. elegans* N2 на газоне *Y. pestis* KIM5, лишенного оперона *hmsHFRS*, в течение суток с последующим переносом на *E. coli* OP50, к 8 дню эксперимента наблюдали гибель большинства особей [Styer et al., 2005]. В то же время к концу двухнедельного эксперимента, описанного в настоящем исследовании, более половины

особей не утратили жизнеспособности, что говорит о незначительном токсическом влиянии *Y. pestis* на нематод либо об его отсутствии. Учитывая тот факт, что взятый в исследование штамм *Y. pestis* KM2083 был способен образовывать биопленку, можно сделать заключение о том, что это свойство возбудителя чумы также не способствует повышению смертности исследуемых нематод.

Ранее выявлено, что при культивировании нематод *C. elegans* на газонах штаммов *Y. pestis*, содержащих мутации в генах *ompT* (*ucoA*), *y3857*, *yapH*, *y1021*, *y0340*, *y2663*, *y3913*, *y0941*, *y4018* выживаемость нематод увеличивается при сравнении с культивированием на газонах с исходным штаммом [Styer et al., 2005; Bartra et al., 2008]. В связи с этим было предположено, что продукты этих генов могут оказывать токсическое действие либо принимать участие в механизме биопленко-независимого летального воздействия на нематод. Для поиска генетических причин различий в результатах анализа выживаемости нематод между нашим и вышеупомянутыми экспериментами проведен анализ последовательностей этих генов (по геному *Y. pestis* KIM10+ (№ NCBI GenBank NC_004088.1)) с последовательностями штамма *Y. pestis* KM2083, использовавшегося в настоящем исследовании. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей установлено 100 % идентичность анализированных генов, что говорит о полной функциональности продуктов этих генов, тогда как причина отсутствия их токсического действия на нематод остается неясной.

Также следует принять во внимание особенность штамма *Y. pestis* KM2083, взятого в исследование. Этот штамм относится к филогенетической линии 4.ANT, для генома штаммов которой характерной особенностью является присутствие дополнительной плазмиды pTP33 [Балахонов и др., 1991; Оглодин и др., 2015; Афанасьев и др., 2016]. Имеются экспериментальные доказательства связи присутствия этой плазмиды с повышенной частотой биопленкообразования в блохах и увеличением размера самой биопленки [Базанова и др., 2018]. Кроме того, любопытным фактом является сходство некоторых участков плазмиды с генами фагов, специфичных для бактерий родов *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* и *Sodalis*, являющихся симбионтами энтомопатогенных нематод [Афанасьев и др., 2016]. Возможно, приобретение возбудителем чумы линии 4.ANT этой плазмиды или отдельных участков могло произойти внутри кишечного тракта нематод, что косвенно свидетельствует о возможности встречи этих двух организмов в природном биоценозе и об отсутствии токсического воздействия *Y. pestis* на круглых червей.

В лабораторных условиях показано, что почвенные нематоды могут локально распространять клетки *Y. pestis* по поверхности субстрата при передвижении с отходящими с поверхности кутикулы кусочками биопленки, так и с выходящими из пищеварительного тракта не подвергшихся перевариванию бактериальными клетками [Thutupalli et al., 2017]. При наблюдении за нематодами *C. elegans* N2 выявлено, что они достаточно активно передвигаются по поверхности агара. На скорость передвижения может влиять как поверхность передвижения, так и присутствие пищевого субстрата (в присутствие пищи скорость составляет 31 ± 4 мкм/с, в отсутствие – 219 ± 29 мкм/с [Ramot et al., 2008]). В совокупности с полученными данными об отсутствии влияния *Y. pestis* KM2083 на продолжительность жизни *Panagrolaimus* sp. 13Н можно сделать предположение о вкладе нематод в распространение возбудителя чумы в почве.

Таким образом, в этом подразделе рассмотрено влияние *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на нематод *Panagrolaimus* sp. (образец 13Н), выделенных на территории природного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Не выявлено различий в продолжительности жизни нематод *Panagrolaimus* sp. при культивировании на газонах штаммов *E. coli* OP50 и *Y. pestis* KM2083, что свидетельствует об отсутствии влияния возбудителя чумы на нематод. Изучаемый штамм продуцировал биопленку на поверхностях нематод в области хвоста и половых органов, в то же время иммобилизации нематод на газоне штамма *Y. pestis* KM2083 не происходило. Внутри кишечного тракта нематод наблюдались конгломераты и отдельные клетки *Y. pestis* KM2083. Все эти факты говорят о возможном распространении клеток возбудителя чумы во время передвижения нематод в почве природных очагов чумы и роли нематод в инициации эпизоотий в очагах.

5.2 Систематическая принадлежность паразитических нематод из природного биоценоза Тувинского горного очага чумы и анализ их микробиоты

Согласно гипотезе вертикальной трансмиссии, нематоды-паразиты блох могут принимать участие в жизненном цикле *Y. pestis*. Нематоды, несущие клетки *Y. pestis*, обеспечивают перенос возбудителя чумы из почвенного биоценоза в наземный при заражении блох на личиночной стадии. Реализация этого механизма в совокупности с распространённостью нематод в природе при наступлении благоприятных условий окружающей среды вполне объясняет «взрывной» характер начала эпизоотий на разных территориях

природного очага чумы. Несмотря на потенциальную роль энтомопаразитических нематод в эпизоотическом процессе *Y. pestis*, имеются ограниченные данные о систематической принадлежности этих организмов. Кроме того, данные о составе микробиоты паразитарной блохо-нематодной системы в литературе отсутствуют. В связи с этим актуальным вопросом является изучение состава энтомопаразитических нематод и их микробного окружения на активных в настоящий момент территориях Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы.

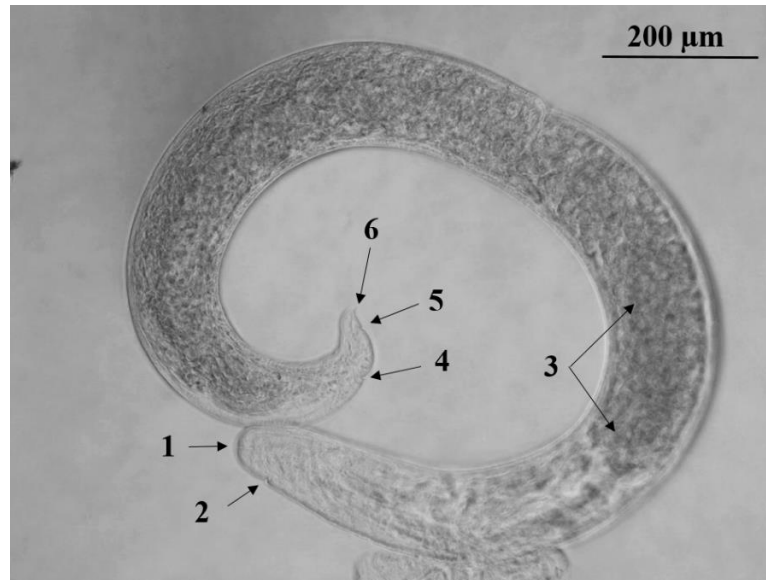
5.2.1 Определение систематической принадлежности энтомопаразитических нематод блох из Тувинского горного очага чумы

В предыдущих исследованиях в блохах был выявлен определенный спектр нематод, включающий мелких спирурид, филяриат (отр. Filariida и Spirurida) и представителей мерметид (сем. Mermithidae), однако истинными паразитами блох считаются представители родов *Psyllotylenchus*, *Howardula*, *Neoparasitylenchus*, *Bradynema*, *Aphanitylenchus*, *Spilotylenchus*, *Rubzovinema* [Рубцов, 1981; Слободянюк, 1991; Koshel et al., 2014]. Было предположено, что, выступая в качестве естественных регуляторов численности блох, паразитические нематоды могут влиять на интенсивность эпизоотических процессов в природных очагах чумы [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011; Koshel et al., 2014]. В связи с этим актуальным направлением исследований является определение спектра нематод-паразитов блох в активных в настоящее время Тувинского горного очага чумы, граничащим с Горно-Алтайским очагом чумы.

Для определения зараженности блох в Тувинском горном очаге чумы сбор проб осуществлялся сотрудником Иркутского противочумного института Е.Г. Токмаковой и сотрудниками Тувинской противочумной станции в мае 2018 г. в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней». Извлечение нематод проводили согласно методическим рекомендациям «Выделение и определение систематической принадлежности энтомопаразитических нематод из блох в условиях природного очага чумы» (Саратов 2014) с модификацией, заключающейся в предварительной обработке блох в 96 % спирте для исключения попадания в образцы посторонней микрофлоры с поверхности блох.

В результате обследования восьми участков природно-очаговой территории Монгун-Тайгинского кожууна Республики Тыва (Кургак правый, Боро-Шивеки, Оругтуг левый, Оругтуг Правый, Чанагаш-Доргун, Чалыяш левая площадка, Оюк-Хем, Оюк-Хем левая площадка) присутствие энтопаразитических нематод было установлено в 84 образцах блох. Видовой состав блох-носителей представлен видами *C. tesquorum* (90,5 % всех образцов) и *Frontopsylla elatoides*. Количество инвазированных самок блох обоих видов преобладало над количеством инвазированных самцов (*C. tesquorum* – 82,9 % самок, *F. elatoides* – 75 % самок). Интенсивность инвазии самок также была выше (в самках *C. tesquorum* от 1 до 8 половозрелых особей, в самцах – от 1 до 3; в самках *F. elatoides* – от 1 до 3; в самцах – 1). Следует сказать, что по результатам изучения интенсивности заражения блох энтомопаразитическими нематодами в период 2019–2021 гг. корреляция от вида, пола и объекта сбора блох отсутствует [Токмакова и др., 2022].

Для определения систематической принадлежности нематод-паразитов блох были взяты в анализ 16 образцов энтомопаразитических нематод из семи участков Тувинского очага (Кургак правый, Боро-Шивеки, Оругтуг левый, Оругтуг правый, Чанагаш-Доргун, Чалыяш, Оюк-Хем). Из этих образцов 14 выделены из блох *C. tesquorum* и 2 – из *F. elatoides*. Выделенные из полости тела нематоды в образцах представлены в нескольких жизненных формах, а именно в виде одной или нескольких половозрелых самок, длина тела которых в ряде случаев достигала 1500 мкм, и большого количества личинок на разных стадиях развития меньшего размера. Изображение половозрелой самки энтомопаразитической нематоды блох представлено на рисунке 5.6. Выявление в носителях только половозрелых самок в отсутствие самцов в *C. tesquorum* и *F. elatoides* из Тувинского горного очага может свидетельствовать о существовании как минимум одной генерации вне полости тела насекомого. Эта особенность жизненного цикла паразитических нематод является одним из характерных признаков родов *Rubzovinema* и *Spilotylenchus* [Рубцов, 1981; Slobodyanyuk, 1997; Slobodyanyuk, 1999; Slobodyanyuk, 2000; Koshel et al., 2014].



1 – стилет; 2 – экскреторная пора; 3 – матка, наполненная яйцами; 4 – вульва; 5 – анус; 6 – мукро. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 100x
 Рисунок 5.6 – Изображение половозрелой самки энтомопаразитической нематоды блох *C. tesquorum* из Тувинского горного очага чумы

Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ энтомопаразитических нематод. В целях установления систематического положения паразитических нематод из 100 мкл образца, содержащих взрослую особь и личинки, выделяли ДНК набором «ДНК-сорб-Д» в соответствии с инструкцией производителя. Методом ПЦР получали протяженный участок 18S–ITS1–5,8S–ITS2–28S генов с помощью праймеров rDNA2 (5'TTTCACCTCGCCGTTACTAAGG3') и 28SR (5'TTGATTACGTCCCTGCCCTTT3') [Vrain et al., 1992]. После секвенирования полученных продуктов нуклеотидные последовательности анализировали с помощью локального выравнивания программой NCBI BLAST алгоритмом megablast. Из последовательностей представителей инфраотряда Tylenchomorpha с наибольшим покрытием по всему анализируемому участку была составлена выборка для установления филогенетических связей. Филогенетический анализ и визуализацию полученной дендрограммы проводили в программе Mega 11 с использованием алгоритма Maximum Likelihood (модель Tamura-Nei). Консенсусное дерево получали методом бутстреп с 500 повторениями.

В результате сравнения нуклеотидных последовательностей, содержащих участки генов 18S, 5.8S, 28S рРНК и межгенных транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS2) энто-

мопаразитических нематод, выделенных на территории Тувинского горного очага, установлен наибольший процент сходства (94,43–97,67 %) с нематодой *Rubzovineta sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1), выделенной в Волго-Уральском степном очаге (Таблица 5.1). Принимая во внимание вариабельность участков ITS1 и ITS2 по сравнению с генами рРНК на основании высоких значений идентичности и покрытия анализируемых последовательностей можно однозначно утверждать о принадлежности нематод из Тувинского горного очага к роду *Rubzovineta*.

Таблица 5.1 – Сравнение последовательностей нематод *Rubzovineta sp.* (KF155281.1) из Волго-Уральского степного очага и образцов из Тувинского горного очага (18S – 28S рРНК)

№ образца, номер в NCBI GenBank	Вид блохи, пол	Место сбора, объект	Идентичность (%)	Покрытие (%)	Длина последовательности (п.н.)
88	<i>C. tesquorum</i> , самец	Кургак правый, входы нор	97,12	99	1011
138	<i>C. tesquorum</i> , самка	Боро-Шивеки, суслик длиннохвостый	97,25	100	726
245	—«—	Чанагаш-Доргун, входы нор	97,46	99	413
250	—«—	—«—	97,67	99	988
253	—«—	Чалыяш, входы нор	97,47	99	990
254	—«—	—«—	97,46	99	989
268	<i>F. elatoides</i> , самка	Оюк-Хем, входы нор	94,43	99	975
269	<i>F. elatoides</i> , самец	—«—	95,73	86	707

Ранее нематоды рода *Rubzovineta* были выделены от шести видов блох в Волго-Уральском степном (*C. tesquorum*, *Amphipsylla rossica*, *C. secundus*) и Горно-Алтайском высокогорном (*A. primaris primaris*, *R. li transbaicalica*, *R. dahurica*) очагах [Ерошенко и

др., 2016; Оглодин и др., 2018; Koshel et al., 2014]. В данной работе нематоды были выделены от двух видов блох (*C. tesquorum*, *F. elatoides*) из Тувинского горного очага чумы, при том что присутствие нематод рода *Rubzovinema* в блохах *F. elatoides* было выявлено впервые. Полученные данные о присутствии нематод *Rubzovinema sp.* у 7 видов блох, выделенных на разных территориях, расширяют известный нам спектр хозяев и свидетельствуют о широком распространении паразитических нематод этого рода в очагах чумы степной зоны России.

Нуклеотидные последовательности участков генов рРНК энтомопаразитических нематод рода *Rubzovinema* депонированы в международной базе данных NCBI GenBank под номерами OR580974–OR580975, OR580977–OR580980, OR580983, OR660114.

Как было упомянуто ранее, анализируемый участок включает последовательности генов 18S, 5.8S, 28S и межгенных транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, которые имеют разный уровень вариабельности. Для уточнения систематической принадлежности анализируемых нематод из Тувинского горного очага чумы возникает необходимость оценить уровень внутривидовой изменчивости по разным участкам генов рРНК. В качестве референсных были использованы последовательности изолятов *R. polyxenica* из Волго-Уральского степного очага. Результаты сравнения всех доступных нуклеотидных последовательностей генов рРНК *Rubzovinema* представлены в таблице 5.2. В качестве референсной использована последовательность нематоды *Rubzovinema sp.* из Волго-Уральского степного очага (№ NCBI GenBank KF155281.1).

Таблица 5.2 – Гомология нуклеотидных последовательностей различных участков генов рРНК нематод рода *Rubzovinema* при сравнении с последовательностью *Rubzovinema sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1), выделенной из блохи *C. tesquorum* с территории Волго-Уральского степного очага

№ образца	Вид блохи	Процент идентичности и размер участков				
		18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
1	2	3	4	5	6	7
Волго-Уральский степной очаг						
KF155282.1	<i>A. rossica</i>	99,38 %	99,30 %	98,68 %	94,87 %	100 %
		162 п.н.	287 п.н.	152 п.н.	305 п.н.	62 п.н.
KF155283.1	<i>C. secundus</i>	99,38 %	99,30 %	98,68 %	94,89 %	100 %
		162 п.н.	287 п.н.	152 п.н.	305 п.н.	62 п.н.

Продолжение Таблицы 5.2

1	2	3	4	5	6	7
Тувинский горный очаг						
88	<i>C. tesquorum</i>	98,77 %	93,52 %	98,68 %	99,68 %	100 %
		162 п.н.	292 п.н.	152 п.н.	312 п.н.	62 п.н.
138	<i>C. tesquorum</i>	–	93,39 %	98,68 %	99,68 %	100 %
			256 п.н.	152 п.н.	312 п.н.	6 п.н.
245	–«–	96,91 %	89,96 %	–	–	–
		162 п.н.	251 п.н.			
250	–«–	100 %	95,21 %	98,68 %	98,40 %	100 %
		162 п.н.	291 п.н.	152 п.н.	311 п.н.	54 п.н.
253	–«–	98,77 %	93,52 %	98,68 %	99,68 %	100 %
		162 п.н.	292 п.н.	152 п.н.	312 п.н.	62 п.н.
254	–«–	98,77 %	93,52 %	98,68 %	99,68 %	100 %
		162 п.н.	292 п.н.	152 п.н.	312 п.н.	62 п.н.
268	<i>F. elatoides</i>	100 %	92,41 %	97,37 %	91,03 %	100 %
		162 п.н.	284 п.н.	152 п.н.	304 п.н.	54 п.н.
269	<i>F. elatoides</i>	96,91 %	94,58 %	–	93,30 %	100 %
		162 п.н.	259 п.н.		217 п.н.	54 п.н.
Горно-Алтайский высокогорный очаг						
1N	<i>A. primaris primaris</i>	–	–	100 %	95,51 %	100 %
				82 п.н.	305 п.н.	62 п.н.
3N	<i>R. li transbaicalica</i>	–	–	97,73 %	91,02 %	100 %
				44 п.н.	318 п.н.	62 п.н.
6N	<i>R. dahurica</i>	–	–	98,39 %	90,71 %	95 %
				63 п.н.	318 п.н.	60 п.н.

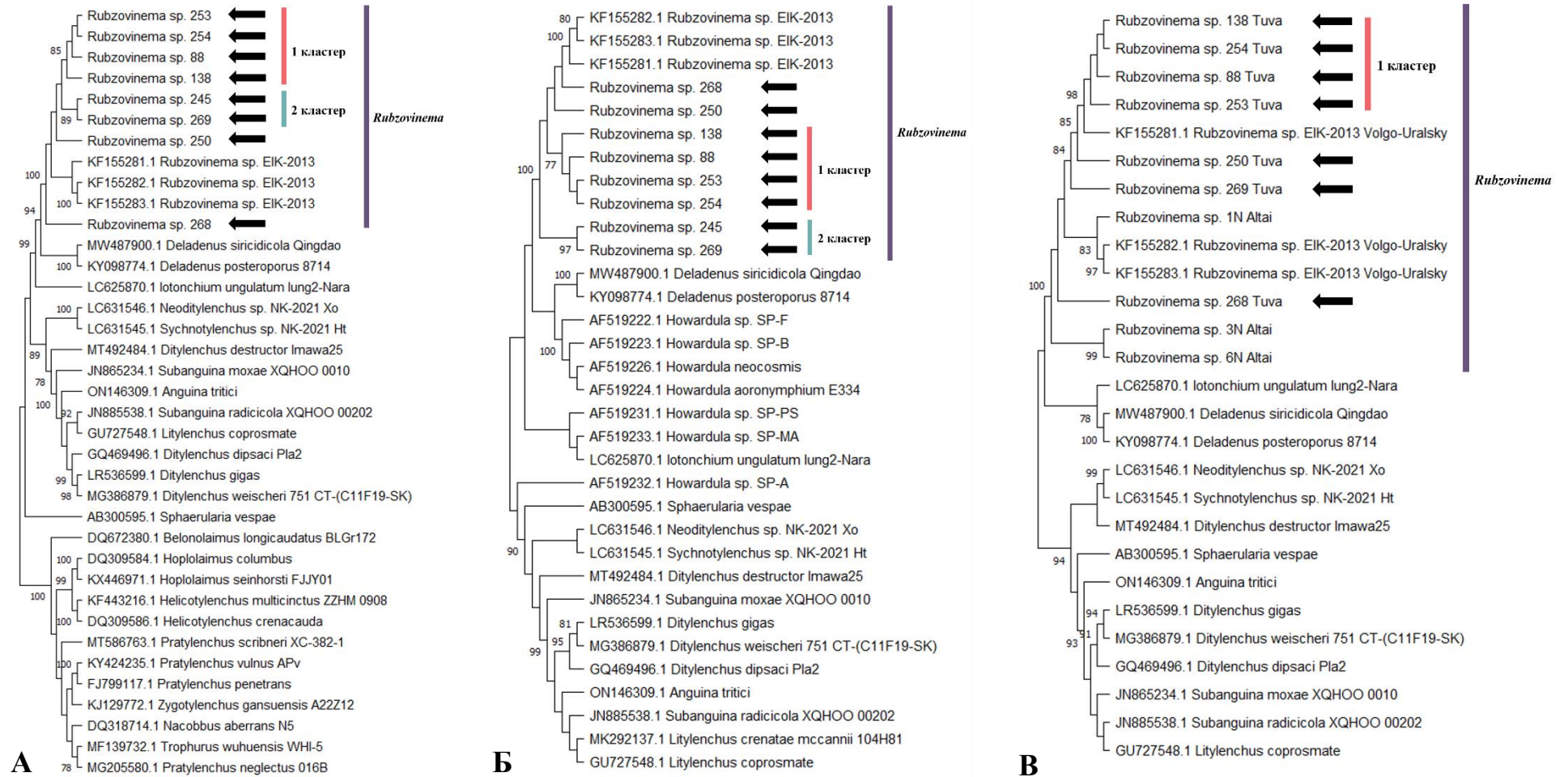
По результатам сравнения участков последовательностей изолятов *Rubzovineta* из Волго-Уральского степного очага, относящихся к одному виду [Ерошенко и др., 2016; Koshel et al., 2014], получены следующие данные. Анализируемый участок гена 18S рРНК имел размер 162 п.н., вариабельность этой области составила 0,62 %. Ген 5.8S был представлен полностью и имел размер 152 п.н., установленная вариабельность последовательностей равнялась 1,32 %. Анализируемый участок гена 28S рРНК размером 62 п.н., и был полностью гомологичен. При рассмотрении последовательностей межгенных спейсеров этих нематод нами выявлена внутривидовая вариабельность последовательности ITS1,

равная 0,7 % (размер 287 п.н.), внутривидовая вариабельность последовательности ITS2 размером 305 п.н. составила 5,11–5,13 %.

В целях дальнейшего уточнения систематического положения анализируемых нематод из Тувинского горного очага чумы вариабельность их последовательностей была сопоставлена с полученными данными о внутривидовой вариабельности *R. polyxenica* из Волго-Уральского степного очага. Также было проведено сравнение последовательностей нематод, выделенных на территории Горно-Алтайского очага чумы для расширения данных внутри этой группы организмов.

В результате анализа участка гена 18S рРНК гомология последовательностей составила 96,91–100 %, гомология гена 5.8S при сравнении с референсной последовательностью практически у всех изолятов была равна 98,68 %, сходство участка 28S между анализируемыми последовательностями составило 100 %. При сравнении последовательностей межгенных спейсеров выявлена гомология участка ITS1 89,96–95,21 %, ITS2 – 90,71–99,68 %. Любопытным фактом является более высокое сходство изолятов 88, 138, 250, 253, 254 тувинских нематод по участку ITS2 с референсной последовательностью *Rubzovinema sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1), по сравнению с другими изолятами из Волго-Уральского степного очага, в то время как по участку более консервативного региона 18S рРНК у изолятов 88, 138, 253, 254 вариабельность последовательностей достигала 1,23 %. Несмотря на различие в последовательности РНК малой субъединицы рибосомы, высокая гомология участка ITS2 позволяет сделать предположение о принадлежности этих изолятов к тому же виду *R. polyxenica*.

Для уточнения отношений внутри группы изолятов *Rubzovinema* был проведен филогенетический анализ по последовательностям различных участков генов рРНК. По причине представленности в базе данных NCBI GenBank последовательностей разных участков генов рРНК строили три варианта дендрограм, для построения которых использовали три различные выборки нематод. Первая выборка включала последовательности 18S–ITS1–5,8S–ITS2–28S представителей семейства Sphaerulariidae и Tylenchoidea, вторая состояла из последовательностей, включающих межгенный спейсер ITS1 (18S–ITS1–5,8S) представителей семейства Sphaerulariidae, третья – последовательностей ITS2 (5,8S–ITS2–28S) представителей семейства Sphaerulariidae. Результаты представлены на рисунке 5.7.



А – по участку 18S–ITS1–5,8S–ITS2–28S; Б – по участку 18S–ITS1–5,8S; В – по участку 5,8S–ITS2–28S. Анализ выполнен в программе Mega 7.0 методом Maximum Likelihood моделью Tamura-Nei. Значения бутстреп-подкрепления ветвей, превышающие 75 %, приведены рядом с ветвями. Стрелками отмечены изоляты из Тувинского горного очага

Рисунок 5.7 – Анализ филогенетических связей нематод *Rubzovinema spp.* из Тувинского горного очага

При рассмотрении филогенетических деревьев, построенных по разным участкам генов рРНК, можно выделить общие закономерности кластеризации. Во всех деревьях представители *Rubzovineta* объединяются в общий кластер с хорошей бутстреп-поддержкой (100 %). Кроме того, внутри общего кластера выделяются две статистически поддерживаемые группы изолятов. В первый кластер вошли изоляты 88, 138, 253 и 254, что соотносится с результатами анализа гомологии последовательностей (Таблица 5.2) и подтверждает высказанное выше предположение об отнесении этих изолятов к виду *R. polyxenica*. Гомология изолята 138 по участку ITS1 немного меньше, но это можно объяснить более короткой длиной этого фрагмента ITS1 и отсутствием 28S. Во второй кластер входят изоляты 245 и 269, имеющие идентичные последовательности гена 18S, тогда как различия в процентах гомологии участка ITS1 обусловлено более короткой последовательностью этого участка. По причине недостающих данных в последовательностях сделать вывод о принадлежности к одному виду с изолятом *Rubzovineta sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1) из Волго-Уральского степного очага не представляется возможным.

Обособленно располагаются изоляты 268 и 250 при том, что оба образца имеют 100 % гомологию с изолятом *Rubzovineta sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1) из Волго-Уральского степного очага по участку 18S гена. Также следует отметить, что по процентам гомологии участка ITS1 изолят 250 имеет наибольшее сходство с референсным изолятом *Rubzovineta sp.* среди всех изолятов из Тувинского очага и достаточно высокий процент гомологии области ITS2, на основании чего этот изолят можно отнести к виду *R. polyxenica*. Что касается изолята 268, то на основании вариабельности последовательностей участков ITS1 и ITS2 при сравнении с изолятом *Rubzovineta sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1), равным 7,59 и 8,97 % соответственно, нельзя сделать вывод о принадлежности этих нематод к одному виду.

Таким образом, в результате анализа энтомопаразитических нематод, выделенных из блох *C. tesquorum* и *F. elatoides*, установлена их принадлежность к роду *Rubzovineta*. По результатам сравнения данных филогенетического анализа с анализом гомологии различных участков генов рРНК можно сделать вывод о принадлежности изолятов 88, 138, 250, 253, 254, выделенных из блох *C. tesquorum* из Тувинского горного очага чумы, к выделенному ранее на территории Волго-Уральского степного очага полигостальному виду

R. polyxenica. Установление систематической принадлежности и филогенетических связей внутри рода паразитов блох необходимо для расширения знаний об этой группе организмов.

5.2.2 Определение состава микробиоты энтомопаразитических нематод из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы

Паразитами блох являются нематоды отряда Tylenchida, способные оказывать влияние на репродуктивную способность носителей и приводить к гибели имаго [Рубцов, 1981]. Однако механизмы, приводящие к кастрации и интерсексуальности блох, описаны недостаточно и остаются на уровне гипотез. Возможно, в этом процессе может участвовать бактериальная микробиота, ассоциированная с паразитическими нематодами. В то время, как роль бактерий *Xenorhabdus* и *Photorhabdus*, симбионтов энтомопатогенных нематод *Steinernema* и *Heterorhabditis*, в уничтожении насекомых-хозяев достаточно изучена [Goodrich-Blair, Clarke, 2007], состав и значение микробных сообществ паразитарной блохо-нематодной системы остаются в значительной степени неизвестными. Кроме того, изучение микробиома этой системы любопытно с точки зрения описания микроокружения, в котором может существовать *Y. pestis*. Таким образом, целью этого раздела было проведение анализа микробиоты паразитарной блохо-нематодной системы из Горно-Алтайского и Тувинского природных очагов чумы по участкам гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства рекомбиназы *recA*.

Образцы блох были собраны на территории Горно-Алтайского очага чумы (Республика Алтай, Кош-Агачский район) и Тувинского очага (Республика Тыва, Монгун-Тайгинский кожуун) в 2017 и 2018 гг. соответственно. Всего было проанализировано 22 образца нематод, из них 16 из Тувинского горного и 6 из Горно-Алтайского очага чумы. Манипуляции по выделению нематод из блох и получению ДНК аналогичны описанным выше, проводившимся при определении систематической принадлежности энтомопаразитических нематод из блох из Тувинского горного очага чумы. Следует сказать, что культивирования на питательных средах и выделения бактериальных культур в настоящем исследовании не проводилось, анализ микробиоты осуществлялся только на основе анализа участков бактериальной ДНК. Реакцию ПЦР проводили с использованием праймеров на участки гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA* (Таблица 5.3). Нельзя

исключить и того, что в образцах нематод также могла присутствовать микробиота блох, попавшая при препарировании насекомых. В связи с этим выявленные в последствии бактерии следует рассматривать в качестве микробиоты паразитарной блохо-нематодного системы.

Таблица 5.3 – Список праймеров, использованных для определения микробиоты паразитических нематод

№	Название	Участок гена (мишень)	Последовательность (5'–3')	Ссылка
1	27F	16S РНК	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Deutch et al., 2006
	805R	(V1-V3)	GACTACCAGGGTATCTAATCC	
2	16symbS F	16S РНК	GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Lane, D.J. (1991)
	16symbS R	(V3-V4)	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC	Herlemann et al., 2011
3	RecA 41F	<i>recA</i>	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG	Vinuesa et al., 2005
	RecA 640R		ACATSACRCCGATCTTCATGC	

После определения нуклеотидных последовательностей полученных продуктов амплификации методом капиллярного секвенирования последовательности анализировали алгоритмом blastn программы NCBI GenBank. Последовательности бактерий считали пригодными для определения систематической принадлежности до рода при покрытии последовательностей не менее 95 % и идентичности не менее 90 %. Результаты анализа последовательностей участков гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA* бактерий, выявленных в составе паразитарной блохо-нематодной системы, приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Результаты сравнения нуклеотидных последовательностей участков гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA* бактерий, выявленных в составе паразитарной блохо-нематодной системы Тувинского горного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы

№	№ образца	Название праймеров	Длина ампликона (п.н.)	Последовательность с наибольшим процентом совпадений, номер в NCBI GenBank	Покрывание, %	Идентичность, %	Вид блохи	Источник сбора	Место сбора
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Тувинский горный очаг									
1	87	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Кургак правый
2	88	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Кургак правый
3	91	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Оругтуг левый
4	92	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Оругтуг правый
5	94	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Оругтуг правый
6	96	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Оругтуг правый
7	111	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Боро-Шивеки
		16symbS F/16symbS R	116	LT629691.1 <i>Pseudomonas</i> sp. BS3779	100	92,31			
8	112	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,73	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Боро-Шивеки
9	138	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,46	<i>C. tesquorum</i>	Суслик длиннохвостый	Боро-Шивеки
10	139	16symbS F/16symbS R	373	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	99,46	<i>C. tesquorum</i>	Суслик длиннохвостый	Боро-Шивеки

Продолжение Таблицы 5.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	245	27F/805R 16symbS F/16symbS R	764	OX366363.1 <i>Wolbachia</i> 26620	100	100	<i>C. tesquorum</i>	Входы нор	Чанагаш-Доргун
Горно-Алтайский высокогорный очаг									
12	1	<i>recA</i>	138	CP045254.1 <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> DTU12.1	100	93,38	<i>Oropsylla si-</i> <i>lantiewi</i>	Сурок алтайский	Вершина Елангаша
13	3	16symbS F/16symbS R	143	JF833685.1 <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> C95	100	97,20	<i>R. li transbai-</i> <i>calica</i>	Пищуха даурская	Богуты
14	4	16symbS F/16symbS R	418	MF612166.1 <i>Brevundimonas diminuta</i> SAS4	100	94,50	<i>R. dahurica</i>	Входы нор	Юстыд
15	5	16symbS F/16symbS R	323	AP022845.1 <i>Cutibacterium acnes</i> SZ2	100	97,21	<i>Amphalius</i> <i>runatus</i>	Пищуха монголь- ская	Юстыд

При сравнении последовательностей участков гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA* при покрытии 100 % и идентичности, превышающей 90 %, в 15 образцах нематод установлена принадлежность бактерий, ассоциированных с нематодами, к таким классам бактерий, как α -протеобактерии, γ -протеобактерии и актиномицеты. Соответствующие показатели покрытия и идентичности также позволяют судить нам о родовой принадлежности выявленных бактерий. Так, в 10 образцах выявлены бактерии рода *Cutibacterium*, в 3 – *Pseudomonas*, в 1 – *Brevundimonas*, в 1 – *Wolbachia*. При сравнении микробиомов нематод из разных природных очагов, установлено, что в нематодах из обоих очагов было выявлено присутствие *Pseudomonas* и *Cutibacterium*. Нематоды, выделенные на территории Тувинского горного очага, характеризовались присутствием бактерий рода *Cutibacterium*, *Pseudomonas* и *Wolbachia*, тогда как в нематодах из Горно-Алтайского высокогорного очага были выявлены бактерии *Pseudomonas*, *Brevundimonas* и *Cutibacterium* (Таблица 5.4).

При анализе нуклеотидных последовательностей участков генов 16S рРНК и гена *recA* размером от 116 до 418 п.н. в 4 образцах были выявлены бактерии, принадлежащие к классу γ -протеобактерий, типу Pseudomonadota. Процент сходства, превышающий 90 % (от 92,31 до 97,20 %) позволил установить принадлежность этих бактерий к родам *Pseudomonas* и *Brevundimonas*. Факт выявления бактерий этих родов являлся в высокой степени вероятным, поскольку они традиционно входят в состав микробиоты как свободноживущих видов (*Acroboloides maximus*, *C. elegans*), так и паразитических нематод (представители родов *Steinernema*, *Pristionchus*) [Rae et al., 2008; Baquiran et al., 2013; Berg et al., 2016; Dirksen et al., 2016; Ogier et al., 2020]. Выявление бактерий этих родов в энтомопатогенных нематодах *Steinernema*, культивируемых на протяжении многих лет в лабораторных условиях, свидетельствует об устойчивости установленной ассоциации «нематода-бактерия» и не является результатом неспецифического загрязнения [Ogier et al., 2020]. В отношении нематод бактерии этих родов рассматриваются в качестве членов нормальной микробиоты, но между тем имеются сведения о нематоцидной активности ряда штаммов *Brevundimonas diminuta*, *P. rhodesiae*, *P. fluorescens* в отношении почвенных галловых нематод рода *Meloidogyne*, паразитирующих на корнях растений, и ряда штаммов *P. aeruginosa* в отношении *C. elegans* [Moazezikho et al., 2020; Ambreetha, Balachandar, 2022; Ye et al., 2022; Sun et al., 2023].

Помимо выявленных бактерий, ассоциированных с нематодами, в настоящем исследовании также было установлено присутствие в *Rubzovinema sp.* бактерий, сведения о встречаемости которых в составе микробиоты нематод являются редкими. Одной из них является *Cutibacterium*, присутствие которой выявлено в подавляющем большинстве образцов изученных энтомопаразитических нематод. При сравнении нуклеотидных последовательностей участков гена 16S рРНК размером 323–373 п.н. установлен высокий процент идентичности (97,21–99,73 %) с видом *C. acnes*. Представители этого вида известны как условно-патогенный для человека вид бактерий, ассоциируемый с кожными воспалениями, но рассматриваемый как и часть нормальной флоры кожи и других частей тела [Mayslich et al., 2021]. Однако согласно результатам метагеномных исследований *C. acnes* широко распространен как в наземных, так и в почвенных и водных биоценозах, и может являться членом микробиоты других организмов [URL: https://microbeatlas.org/index.html?action=taxon&taxon_id=90_15360;96_410;97_465;98_535;99_663&stattab=map (дата обращения 03.01.2024)]. Так, представители семейства Propionibacteriaceae (Cutibacteriaceae) выявлены в почвенных нематодах *C. elegans* [Berg et al., 2016], а присутствие *C. acnes* установлено в составе микробного сообщества морских нематод *Daptonema* и морских полихет *Capitella teleta* [Lancaster, et al., 2018; Jang et al., 2022]. Что касается функциональной роли *C. acnes* в составе микробиоты, предполагается, что продуцируемые бактериями пропионат и витамин В₁₂ необходимы для поддержания оптимальных условий в кишечнике многощетинковых червей [Jang et al., 2022]. Кроме того, часть штаммов *C. acnes* являются патогенными для *C. elegans*, тогда как непатогенные *C. acnes* не влияют на длительность жизненного цикла *C. elegans* и придают устойчивость к условно-патогенным бактериям *S. aureus* за счет активации сигнальных путей иммунной системы нематод [Tsuru et al., 2021].

Еще одной выявленной бактерией в настоящем исследовании, нехарактерной для нематод, бактерия рода *Wolbachia*. Из одного образца энтомопаразитических нематод с помощью двух пар праймеров (27F/805R, 16symbS F/16symbS R) на различные участки гена 16S рРНК были получены два перекрывающихся по локусу V3 ампликона. В ходе капиллярного секвенирования были определены их нуклеотидные последовательности размерами 517 и 480 п.н. соответственно. Длина общей нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК по локусам V1-V4 составила 764 п.н. и депонирована в международ-

ную базу данных NCBI GenBank под номером OR568562. В результате сравнения с последовательностями в базе данных NCBI GenBank при 100 % покрытии последовательностей выявлена 100 % идентичность с изолятом *Wolbachia* 26620, эндосимбионтом *Epistrophe grossularia* (GenBank ID: OX366363.1). Известно, что представители этого рода являются облигатными внутриклеточными микроорганизмами, имеющими различные эндосимбиотические отношения с рядом членистоногих и нематод. Ранее присутствие *Wolbachia* было установлено у филяриальных нематод (подотряд Spirurina) и фитопаразитических нематод *Pratylenchus penetrans* и *Radopholus similis* (подотряд Tylenchina, надсемейство Tylenchoidea), однако выявление этих бактерий в нашем исследовании, равно как и в родственной группе нематод *Howardula* (подотряд Tylenchina, надсемейство Sphaerulariodes), входящих в одно надсемейство с нематодами *Rubzovinema spp.*, значительно расширяет список хозяев *Wolbachia* [Dudzic et al., 2022]. Представители этой группы бактерий выявлены у широкого спектра членистоногих и способны оказывать влияние на репродуктивные функции своих хозяев (феминизация, партеногенез, цитоплазматическая несовместимость, гибель самцов) [Werren et al., 2008]. Нельзя исключать возможность влияния *Wolbachia sp.* как на энтомопаразитических нематод, в которых был обнаружен этот штамм, так и на блох. Широко известен феномен кастрации блох, который ранее связывали с оказываемым влиянием на них паразитических нематод, в то время как точный механизм не описан. Ввиду отсутствия видимых изменений у блох наружных и внутренних частей органов был сделан вывод о снижении плодовитости посредством функциональных нарушений [Козлов и др., 1985]. Можно предположить, что возможную роль в этом процессе играют патогенные для членистоногих микроорганизмы, в том числе и выявленная в настоящем исследовании *Wolbachia*. Однако это предположение требует дальнейшего изучения как разнообразия микробиоты, ассоциированной с нематодами, так и ее функциональной роли в жизненном цикле нематод и их членистоногих хозяев.

В результате проведенного исследования нам не удалось выявить специфичных для рода *Rubzovinema* бактерий. Это может значить, что эти нематоды не несут собственных уникальных бактериальных сообществ. Также возможно, что в процессе настоящего исследования методические ограничения не позволили обнаружить виды бактерий, составляющих ассоциации с нематодами. Метод высокопроизводительного секвенирования яв-

ляется более предпочтительным для этих целей и позволяет получить больше информации. В то же время наиболее распространенными в ряде образцов нематод были бактерии родов *Cutibacterium* и *Pseudomonas*, выделенных из блох Горно-Алтайского и Тувинского очагов. Эти бактерии могут являться бактериями-ассоциантами, на которые нужно обратить пристальное внимание при изучении микробиоты *Rubzovinema spp.* в других природных очагах чумы. Результаты настоящего исследования создают отправную точку для понимания взаимодействий между блохами, энтомопаразитическими нематодами и их микробиотой в условиях природных очагов чумы. Выявленные бактериальные таксоны позволяют отслеживать изменения в микробиоме, которые могут привести к изменению характера взаимодействия «нематода-блоха» с паразитического на патогенный для насекомого, а также могут оказать влияние на потенциальное взаимодействие с возбудителем чумы.

Таким образом по результатам главы 5 в составе почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы было выявлено присутствие нематод рода *Panagrolaimus* и представителя семейства Diplogasteroidae. Получены новые данные об отсутствии влияния *Y. pestis* на продолжительность жизни нематод *Panagrolaimus sp.*, выделенных на территории одного биоценоза. В совокупности с данными об образовании биопленки на кутикуле нематод в области половых органов и хвоста и присутствии клеток *Y. pestis* в кишечнике нематод полученные результаты могут свидетельствовать о роли нематод в процессе распространения возбудителя чумы в почве. Также установлена систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод блох с территорий Тувинского горного очага чумы к роду *Rubzovinema*, выявленному ранее также на территориях Горно-Алтайского высокогорного и Волго-Уральского степного очагов. Полученные данные свидетельствуют о широком ареале распространения энтомопаразитических нематод рода *Rubzovinema* в границах степной зоны России. Впервые охарактеризована микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из очагов Горного Алтая, в состав которой входят представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно рода *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*. Нами обнаружено сходство в составе микробного сообщества блохо-нематодной системы вне зависимости от географического происхождения, а именно присутствие бактерий родов *Cutibacterium* и *Pseudomonas* в нематодах из Горно-Алтайского и Тувинского очагов. Все эти сведения

расширяют представления об условиях и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы в процессе своего жизненного цикла. Эти факты дополняют имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов чумы, что важно для понимания закономерностей их функционирования, а также для практики в целях оптимизации комплекса проводимых профилактических мероприятий на очаговых территориях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с классическими постулатами теории природной очаговости чумы возбудитель чумы *Y. pestis* сохраняется в природном биоценозе, циркулируя между носителями (преимущественно грызуны) и переносчиками артроподами (блохи, клещи, вши). На протяжении длительного времени господствовало мнение о невозможности сохранения *Y. pestis* вне паразитарной системы «грызун-блоха-грызун». Однако накапливается все больше данных, не согласующихся во всем с классической концепцией сохранения возбудителя и рассматривающих в качестве еще одной экологической ниши его существования почвенный биоценоз и его микрофауну.

Ранее в ряде экспериментов было показано сохранение *Y. pestis* в ассоциации с почвенными простейшими – *H. rhyodes*, *T. pyriformis*, *D. discoideum*, *A. castellanii* и круглыми червями – нематодами *C. elegans* [Никульшин и др., 1992; Пушкарева, 2003; Кошель и др., 2016; Darby et al., 2002; Benavides-Montaño, Vadyvaloo, 2017; Markman et al., 2018]. Разрабатывается гипотеза вертикальной трансмиссии *Y. pestis*, согласно которой возбудитель чумы может попадать из почвенного биотопа в наземный, используя альтернативную паразитарную систему трансмиссии «энтомопаразитические нематоды – блохи». Однако доказательства участия почвенных организмов (простейших, нематод) в жизненном цикле *Y. pestis* имеют разрозненный характер, а в экспериментах по моделированию взаимодействия использованы музейные штаммы, лабораторные культуры и виды почвенной микрофауны. Ограниченность получаемых результатов таких экспериментов связана с тем, что штаммы *Y. pestis* и представители почвенной микрофауны выделены в разных природных биотопах и не адаптированы к друг другу в процессе эволюции.

В нашем исследовании был применен иной методический подход по моделированию взаимодействия организмов, эволюционно приспособленных к обитанию в одном биоценозе. В качестве модельной экосистемы был выбран Горно-Алтайский высокогорный очаг, в котором на протяжении нескольких десятков лет регистрируется эпизоотическая активность, а с 2012 г. выявлено распространение эпидемически значимых и высоковирулентных штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT. Штаммы 4.ANT циркулируют на эндемичной территории трех близко расположенных природных очагов России и Монголии, и до сих пор вопрос происхождения распространившихся штаммов во

второй декаде XXI века в Горно-Алтайском высокогорном очаге остается дискуссионным. Причиной выбора Горно-Алтайского высокогорного очага в качестве модельной территории для изучения механизмов персистенции *Y. pestis* стала возможность получения свежих культур бактерий и организмов почвенной микрофауны из одного природного биотопа.

На первом этапе необходимым было получение представления об особенностях современных штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT и их отличий от штаммов других линий этого биовара. Штаммы 4.ANT относятся к древней линии античного биовара, возникшей в точке большого взрыва (Big Bang) наряду с другими линиями этого биовара 1.ANT–3.ANT от предшественника 0.ANT [Cui et al., 2013; Valtueña et al., 2022]. С тех пор эти линии эволюционировали независимо, накапливая мутации в ходе эволюционного приспособления к различным ландшафтно-географическим условиям. Штаммы 4.ANT эндемичны для Горного Алтая и Тувы в России и Монголии. В других регионах мира они не встречаются и поэтому малодоступны для изучения зарубежными исследователями.

Для сравнения фенотипических свойств в исследование были взяты штаммы *Y. pestis* основного подвида античного биовара, выделенные в разных странах (Российская Федерация, Монголия, Китайская Народная Республика, Кыргызская Республика, Кения и Демократическая Республика Конго) в период 1928–2020 гг. Выявленное филогенетическое разнообразие взятых в исследование штаммов возбудителя чумы (0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT) предоставило возможность полнее оценить вариабельность комплекса свойств внутри античного биовара. Все взятые в исследование штаммы обладали типичными для античного биовара биохимическими свойствами, но отличались различными потребностями в факторах роста, связанными с их географическим происхождением и филогенетической принадлежностью. Помимо универсальной зависимости роста штаммов основного подвида от треонина, метионина и фенилаланина, ранее показанной в работе Л.М. Куклевой и др. [Куклева и др., 2013], примененный в настоящем исследовании подход в изучении фенотипических проявлений зависимостей роста от аминокислот с опорой на филогенетическую принадлежность штаммов позволил выявить ауксотрофность отдельных филогеографических популяций античного биовара по лейцину, пролину и цистеину. При рассмотрении метаболических путей синтеза аминокислот штаммов античного биовара найдены мутации, которые могут вносить вклад в

ауксотрофность за счет влияния на функциональность ферментов. Кроме того, выявленные мутации могут быть использованы в качестве генетических меток для дифференциации штаммов *Y. pestis* различных филогенетических групп античного биовара.

Проведенный нами анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара различных филогенетических линий позволил определить место исследуемых штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT с территории Горно-Алтайского высокогорного очага в структуре античного биовара. Исследованные штаммы *Y. pestis* 4.ANT обладают характерными для всех штаммов античного биовара биохимическими свойствами, а также нуждаются для своего роста в классической триаде аминокислот – фенилаланин, треонин и метионин. Однако в отличие от всех других линий античного биовара не все популяции штаммов 4.ANT нуждаются в аминокислоте цистеин. Это может быть обусловлено адаптацией к конкретным ландшафтно-географическим условиям. Установленная зависимость роста штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT от присутствия в среде аминокислот была учтена при планировании экспериментов по моделированию взаимодействия с почвенной микрофауной. Результаты филогенетического анализа, анализа зависимости роста от цистеина и сравнения генов биосинтеза цистеина и обмена серы позволили выявить 4 отдельные популяции внутри филогенетической линии 4.ANT. Популяция штаммов из Горно-Алтайского высокогорного очага демонстрировала вариабельность зависимости роста от цистеина и обладала сходным профилем мутаций со штаммами, выделенными на территории Монголии, что подтверждает близкое родство штаммов 4.ANT, циркулирующих на российской (Горно-Алтайский высокогорный) и монгольских частях Сайлюгемского природного очага чумы и природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан в Монголии.

Для визуализации экспериментов по изучению взаимодействия возбудителя чумы с членами почвенной микрофауны, а именно для установления локализации клеток *Y. pestis* внутри амёб и нематод, было проведено конструирование штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, продуцирующих флуоресцентные белки. Полученные с помощью плазмид pTurboGFP-B и pKatushka2S-B штаммы значительно упростили детекцию бактериальных клеток в образцах и селекцию колоний за счет устойчивости рекомбинантных клеток к ампициллину в среде и флуоресценции в заданной области спектра. Важным моментом в использовании этих штаммов для моделирования взаимодействий с членами почвенной микрофауны было сохранение свойств исходного штамма *Y. pestis* у

штаммов-реципиентов плазмид. Установлено, что трансформирование плазмидами не привело к изменению культурально-морфологических и биохимических свойств, чувствительности к бактериофагам и вирулентности штаммов *Y. pestis*, что подтверждает возможность использования сконструированного набора флуоресцентных штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT для изучения локализации и взаимодействия бактериальных клеток с микро- и макроорганизмами.

Следующим шагом исследования было выделение доминирующих видов почвенных простейших на разных эпизоотически активных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в целях дальнейшего моделирования взаимодействий между ними и штаммами *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT. В результате анализа последовательностей генов рРНК, включающих участки генов РНК большой и малой субъединиц рибосом и расположенные между ними последовательности гена 5.8S и двух внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2), доказана систематическая принадлежность выделенных простейших к видам *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*, являющихся повсеместно распространенными организмами почвенных экосистем. Присутствие амёб *A. castellanii* в высоких концентрациях (до 300 тыс. клеток на 1 г почвы) в почвенных биоценозах природных очагов чумы ранее было установлено в Северо-Западном Прикаспии и Горном Алтае, что указывает на широкое географическое распространение этого вида [Кошель и др., 2015; Оглодин и др., 2017]. Кроме того, в ряде исследований показана возможность взаимодействий и сохранения *Y. pestis* в ассоциации с *A. castellanii* и другими представителями рода *Dictyostelium*, *D. discoideum* [Кошель и др., 2016; Benavides-Montaño, Vadyvaloo 2017; Оглодин и др., 2017; Markman et al., 2018]. В совокупности с этими фактами выделенные простейшие могут оказывать влияние на жизненный цикл *Y. pestis*, в связи с чем рассматриваются в качестве потенциальных резервуаров возбудителя чумы в почвенной фазе в природных очагах чумы и являются перспективными модельными организмами для изучения взаимодействий с *Y. pestis*.

Для эксперимента по совместному культивированию с возбудителем чумы были выбраны амёбы *A. castellanii* как наиболее перспективные организмы для сохранения возбудителя за счет образуемой ими защитной двухслойной цисты, предохраняющей от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Эти амёбы в больших количествах присутствуют в почвах, в том числе и в почве Горно-Алтайского высокогорного очага чумы,

поэтому наиболее вероятным является контакт возбудителя чумы именно с этим доминирующим в почве видом простейших. Важной деталью, обусловившей выбор конкретного изолята простейших, была непосредственная близость участка его выделения с местом получения используемого штамма *Y. pestis*. По результатам наблюдения за сокультурой *Y. pestis* и *A. castellanii*, инкубируемой на твердой питательной среде, установлен положительный таксис клеток акантамеб к бактериальным колониям, как и в работе С. В. Никульшина и соавторами в случае с амебами *H. rhyssodes* и *V. hartmanni* [Никульшин С. В., 1992]. Также на наличие взаимодействий между двумя исследуемыми культурами указывает присутствие на питательной среде вторичных колоний возбудителя чумы, вероятно образованных при перемещении амеб с внутриклеточно локализованными *Y. pestis*.

Изучение взаимодействий *Y. pestis* в сокультуре с простейшими в жидкой среде ранее проводили в средах, содержащих питательные вещества (питательный бульон, вытяжка из почвы, прудовая вода), что до конца не позволяло связать увеличение концентрации бактериальных клеток с взаимодействием с простейшими [Пушкарева, 2003; Оглодин и др., 2017]. Во избежание возможного размножения бактерий за счет ресурсов среды, культивирование организмов мы проводили в солевом буфере, поддерживающем жизнедеятельность амеб, но не содержащем необходимых органических веществ для *Y. pestis*, в том числе необходимых для роста штаммов линии 4.ANT аминокислот фенилаланин, треонин и метионин. Применение этого методического подхода позволило оценить влияние фактора присутствия в среде амеб *A. castellanii* на динамику численности возбудителя чумы. В результате сокультивирования выявлена динамика численности популяции *Y. pestis*, характерной особенностью которой явились колебания численности возбудителя чумы, свидетельствующие о наличии межпопуляционных взаимодействий сокультур. При сравнении с динамикой, полученной при сокультивировании аналогичных организмов в питательном бульоне LB в течение двух недель, временные промежутки повышений и сокращений численности бактериальной популяции совпадали, в то время как в нашем исследовании колебания были более резкими за счет отсутствия, по видимому, независимого от амеб размножения бактерий в питательной среде [Оглодин и др., 2017]. Кроме того, в настоящем исследовании колебания численности наблюдались через 1 и 5 месяцев после начала сокультивирования, что также свидетельствует о наличии взаимодействий между популяциями организмов, заключающихся в использовании возбудителем чумы ресурсов амеб для размножения.

Следует заметить, что при длительном сокультивировании *Y. pestis* и *A. castellanii* в жидкой среде на протяжении 7 месяцев в образцах, помимо неактивных форм амёб в цистах, присутствовали амёбоидные трофозоиты, способные поглощать клетки возбудителя чумы. Это свидетельствует о присутствии в среде пула активных фагоцитирующих клеток амёб, способных вступить во взаимодействия с вышедшими из других амёб и реплицирующимися внеклеточно клетками *Y. pestis*, как отмечал J. Benavides-Montaño с соавторами [Benavides-Montaño J., 2017]. Результатом моделирования долговременного сохранения *Y. pestis* стало установление способности возбудителя чумы сохранять жизнеспособность до 22 месяцев в сокультуре с *A. castellanii* по сравнению с контрольными образцами без амёб, полностью исчезавшими через 2 месяца эксперимента. Также установлено, что длительное сокультивирование организмов не привело к изменению морфологических, биохимических и генетических свойств *Y. pestis*. Важным результатом этой работы является установление сохранения вирулентности штамма возбудителя чумы после 22 месяцев сокультивирования с амёбами в минимальной среде, доказанной фактом сохранения генетических детерминант вирулентности и гибелью всех взятых в эксперимент белых мышей. Сохранение основных свойств и вирулентности *Y. pestis* является важной составляющей для рассмотрения акантамёб в качестве защитных и репликативных ниш, поддерживающих потенциально вирулентный пул клеток *Y. pestis* в почве природных очагов чумы.

Дальнейшим шагом настоящего исследования было выделение из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и установление систематической принадлежности свободноживущих нематод и изучение их взаимодействий со штаммом *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT. В результате анализа участка гена 18S рРНК установлено присутствие нематод рода *Panagrolaimus*, относящихся к группе бактериодетритофагов и распространенных в различных типах почв и биоценозов Республики Алтай, что подчеркивает вероятность встречи этих нематод с клетками возбудителя чумы в почве [Гагарин, 2001; Сущук и др., 2022; Oglodin et al., 2019]. На другом участке Горно-Алтайского высокогорного очага чумы были выявлены нематоды семейства Diplogasteroidae, однако видовую принадлежность этих нематод установить не удалось по причине отсутствия нуклеотидных последовательностей с высокой степенью идентичности в генетических базах данных, что может свидетельствовать о том, что этот изолят

выявлен впервые или является представителем неизвестного в настоящий момент таксона. На основании результатов филогенетического анализа эти нематоды входят в общий кластер с нематодами-паразитами насекомых, из чего может следовать вывод об определенном влиянии этих нематод на паразитарную систему природных очагов чумы. В эксперименте по моделированию взаимодействия были использованы нематоды рода *Panagrolaimus*, выделенные на территории того же участка очага, что и штамм *Y. pestis*. Кроме того, выбор этих нематод обусловлен широким распространением этого рода в различных типах почв Республики Алтай и принадлежностью к трофической группе избирательных бактерио-детритофагов, что повышает вероятность их возможной встречи с возбудителем чумы в природном биоценозе [Гагарин, 2001; Сущук и др., 2022; Oglodin et al., 2018]. При культивировании *Panagrolaimus sp.* на газоне флуоресцентного штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT отмечено образование биопленки на кутикуле нематод в области половых органов и хвоста и присутствие клеток *Y. pestis* в кишечнике нематод, как ранее сообщали в своих работах ряд авторов [Darby et al., 2002; Видяева и др., 2009; Кошель, 2015; Styer et al., 2005]. Кроме того, в большинстве работ отмечено сокращение длительности жизни нематод при блокировании биопленкой возбудителя чумы, в то время как в нашем исследовании получены данные об отсутствии влияния *Y. pestis* на продолжительность жизни нематод *Panagrolaimus sp.* Е. И. Кошель отмечала отсутствие гибели свободноживущих нематод при культивировании на газонах штаммов возбудителя чумы, и в нашем исследовании мы наблюдали такие же результаты [Кошель и др., 2015]. В совокупности с данными о широком распространении нематод этого рода, образовании биопленки на кутикуле нематод и отсутствии негативных воздействий на них *Y. pestis* полученные результаты могут свидетельствовать о потенциальной роли нематод в процессе распространения возбудителя чумы в почве.

Поскольку гипотеза вертикальной трансмиссии предусматривает участие в трансмиссии возбудителя чумы паразитических нематод на трансларвальной стадии развития значительный интерес представляло рассмотрение спектра нематод, паразитирующих в блохах, основных векторах переноса *Y. pestis*. Известно, что эта группа нематод способна регулировать численность блох за счет оказываемого негативного влияния на репродуктивную активность артропод [Рубцов, 1981; Попов, 2007; Кутырев 2009, Koshel et al., 2017]. Ранее на территориях Горно-Алтайского высокогорного и Волго-Уральского степного очагов была установлена циркуляция полигостального вида энтомопаразитических

нематод *R. polyxenica*, паразитирующего на 6 видах блох [Ерошенко, 2016; Koshel et al., 2017; Оглодин 2018], однако систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод с территории Тувинского горного очага чумы, граничащего с Горно-Алтайским высокогорным, оставалась неизвестной. В результате анализа последовательностей протяженного участка 18S–ITS1–5,8S–ITS2–28S рибосомальных генов нематод блох *S. tesquorum* и *F. elatoides* с территорий Тувинского горного очага установлена их систематическая принадлежность к роду *Rubzovinema*, а для части нематод систематическая принадлежность уточнена до вида *R. polyxenica*. Полученные данные свидетельствуют о широком ареале распространения энтомопаразитических нематод этого рода на значительных пространствах степной зоны России.

Помимо определения спектра энтомопаразитических нематод, немаловажным является определение микробного окружения, в котором может существовать *Y. pestis*. По этой причине нами была впервые охарактеризована микробиота паразитарной системы «энтомопаразитические нематоды-блохи» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы при анализе участков гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA*. В составе микробиоты нами выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно рода *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*. Обнаружено сходство в составе микробного сообщества блохо-нематодной системы вне зависимости от географического происхождения, а именно присутствие бактерий родов *Cutibacterium* и *Pseudomonas* в нематодах из Горно-Алтайского и Тувинского очагов. Все эти сведения расширяют наши представления об условиях и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы в процессе своего жизненного цикла и дополняют имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов чумы, что важно для понимания закономерностей их функционирования, и, как следствие, для оптимизации комплекса проводимых профилактических мероприятий.

Нами в настоящей работе рассмотрены взаимоотношения организмов, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Поскольку циркулирующие на этой территории штаммы *Y. pestis* являются мономорфной в эволюционном плане группой, правомерно экстраполирование наших результатов на всю эту территорию, несмотря на то, что в работе для моделирования взаимодействий были использованы организмы с одного участка Горно-Алтайского высокогорного очага. В ряде публикаций было показано образование более массивной биопленки на абиотических (полистирол, стекло) и биотических

(кутикула нематод, преджелудок блохи *C. tesquorum altaicus*) поверхностях штаммами этой группы, несущими дополнительную плазмиду рTP33 по сравнению с другими штаммами основного подвида [Кошель, 2015; Базанова и др., 2017]. В то же время в составе матрикса биопленки штамма *Y. pestis* KM932 филогенетической линии 4.ANT из Тувинского горного очага чумы не было выявлено характерного для возбудителя чумы экзополисахарида N-ацетил-D-глюкозамина, и продуцируемая им биопленка блокировала меньше 50 % нематод в эксперименте [Кошель, 2015; Базанова и др., 2017]. Возможным объяснением этих явлений может быть адаптация штаммов 4.ANT к этим блохам и функциональный вклад плазмиды рTP33 в повышение продукции биопленки [Базанова и др., 2017]. Также высока вероятность, что полученные нами результаты валидны для всех штаммов *Y. pestis* основного подвида, поскольку в работе Е. И. Кошель показаны общие тенденции биопленкообразования и устойчивости к фагоцитозу простейшими и внутриклеточному сохранению, отличные между штаммами возбудителя чумы основного и неосновных подвигов [Кошель, 2015].

В результате выполнения настоящего исследования были решены все поставленные задачи и достигнута цель исследования, заключающаяся в установлении характера взаимодействий *Y. pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Клетки амёб *A. castellanii*, распространенных обитателей почв Горного Алтая, могут выступать для *Y. pestis* в роли потенциальных репликативных ниш, доказательством чему служит увеличение концентрации возбудителя чумы при совместном культивировании с амёбами. Кроме того, популяция *A. castellanii* способна поддерживать длительное сохранение *Y. pestis* в отсутствие органических питательных веществ в минимальной жидкой среде. Благодаря сконструированным штаммам, продуцирующим флуоресцентный белок, доказана локализация возбудителя чумы внутри цист амёб, демонстрирующая возможность использования простейших в качестве защитных ниш. *Y. pestis* образует биопленку на кутикуле нематод *Panagrolaimus sp.*, также выделенных из почв Горного Алтая, и локализуется внутри пищеварительного тракта, не оказывая влияния на жизнеспособность нематод, из чего можно сделать вывод о возможном участии нематод в распространении возбудителя чумы в пределах почвенного биотопа. Данные об особенностях и закономерностях взаимодействий с почвенной микрофауной, полученные в настоящем исследовании, пополняют знания в области экологии возбудителя чумы и механизмов энзоотии чумы. В совокупности с приведенными данными все более очевидным

становится участие представителей почвенной микрофауны в сохранении и распространении *Y. pestis* в пределах почвенного биоценоза природного очага, а также их роль в активизации эпизоотических процессов.

В дальнейших исследованиях актуальными вопросами являются изучение на расширенной выборке особенностей штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT в приспособлении к локальным биоценозам, а именно функциональной роли плазмиды pTP33, изучение состава матрикса биопленки, выявление причин и роли вариабельности потребности в цистеине штаммов *Y. pestis* этой группы. Важными вопросами в области изучения взаимодействия с простейшими и сохранения в природных очагах чумы являются выявление влияния биопленок *Y. pestis* на жизнедеятельность простейших и воздействия процесса выедания простейшими на популяцию возбудителя чумы, в том числе в мультивидовых бактериальных сообществах, а также изучение длительного сохранения *Y. pestis* в нематодах. Также перспективным является получение воспроизводящейся культуры энтомопаразитических нематод и моделирование заражения личинок блох инфицированными нематодами для установления возможности вертикальной трансмиссии возбудителя чумы.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горного Алтая и Тувы имеют общие потребности роста в аминокислотах треонин, метионин, фенилаланин с другими штаммами античного биовара, но в отличие от них переменны по признаку зависимости от цистеина. Штаммы других линий античного биовара имеют дополнительные потребности в лейцине и пролине. В 14 генах метаболических путей серы и цистеина античного биовара выявлено 19 мутаций, для большинства эволюционных линий характерен свой мутационный профиль этих генов.

2. Сконструированы рекомбинантные штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с плазмидами флуоресценции pTurboGFP-B и pKatushka-2S, не отличающиеся по свойствам и вирулентности от исходных штаммов и позволяющие моделировать взаимодействие с членами почвенной микрофауны Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

3. В почвах нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы выявлены цистообразующие амёбы *A. castellanii* и представители миксомицет *D. sphaerocephalum*. В эксперименте по совместному культивированию с простейшими *A. castellanii* из Горно-Алтайского высокогорного очага установлена способность *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT сохраняться в солевом буфере в отсутствие необходимых органических веществ до 22 месяцев без изменения основных свойств и вирулентности.

4. Установлено, что в почвах нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы распространены свободноживущие нематоды рода *Panagrolaimus* и семейства Diplogasteroidea. Показана способность штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT формировать биопленку на кутикуле почвенных нематод в области половых органов и хвоста и образовывать конгломераты клеток *Y. pestis* в пищеварительном тракте нематод. Не обнаружено значимого влияния на продолжительность жизни нематод *Panagrolaimus sp.* на протяжении 24 часов их культивирования на газоне штамма *Y. pestis* линии 4.ANT.

5. Выявлено присутствие энтомопаразитических нематод рода *Rubzovinema* в блохах *C. tesquorum* и *F. elatoides* из Тувинского горного очага чумы. В составе микробиоты паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДРК – Демократическая Республика Конго

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная рибонуклеоновая кислота

РФ – Российская Федерация

КОЕ – колониеобразующая единица

IS – инсерционные последовательности insertion sequences

ITS – внутренний транскрибируемый спейсер (от англ. internal transcribed spacer)

рTP33 – плаزمида, характерная для штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT

SNP – полиморфизм единичных нуклеотидов (от англ. single nucleotide polymorphism)

nsSNP – несинонимичный SNP (от англ. non-synonymous SNP)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акиев, А.К. К вопросу о сохранении чумы в Волго-Уральском песчаном очаге в неэпизоотические годы / А.К. Акиев, И.А. Бахтигозина, А.В. Гнетюк [и др.] // Проблемы особо опасн.инф. – 1971. – Вып. 1(17). – С. 5–11. – Текст: непосредственный.
2. Акиев, А.К. О микроочаговости чумы диких грызунов / А.К. Акиев // Природн. очаговость, микробиол. и профилакт. зоонозов. – 1989. – С. 53–60. – Текст: непосредственный.
3. Афанасьев, М.В. Анализ нуклеотидной последовательности криптической плазмиды рTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы / М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов, Е.Г. Токмакова, и др. // Генетика. – 2016. – № 9. – С.1012–1020. – Текст: непосредственный. – doi: 10.7868/S0016675816090022.
4. Базанова, Л.П. Влияние плазмидного состава *Yersinia pestis* на образование биопленки в организме блох с разной векторной активностью / Л.П. Базанова, Е.Г. Токмакова, Г.А. Воронова, С.В. Балахонов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 2. – С. 76–83. – Текст: непосредственный.
5. Балахонов, С.В. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии / С.В. Балахонов, С. Ценджав, А. Эрдэнебат // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1991. – № 11. – С. 27–29. – Текст: непосредственный.
6. Балахонов, С.В. Первый случай выделения *Yersinia pestis subsp. pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение I. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята / С.В. Балахонов, М.В. Афанасьев, М.Ю. Шестопапов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 1. – С. 12–16. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-60-65>.
7. Балахонов, С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош–Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты / С.В. Балахонов, А.Ю. Попова, А.И. Мищенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 55–60. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-55-60>.
8. Бренева, Н.В. Экологические закономерности существования патогенных иерсиний в почвенных экосистемах / Н.В. Бренева, А.С. Марамович, В.Т. Климов // Журнал

- микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 6. – С. 82–88. – Текст: непосредственный.
9. Вариводина, Т.А. К изучению длительности сохранения возбудителя чумы в почве нор серого сурка / Т.А. Вариводина, П.А. Полулях, К.А. Кузнецова [и др.] // Проблемы особо опасн. инф. – 1970. – Вып. 2. – С. 187–189. – Текст: непосредственный.
10. Васильев, Н.В. Лабораторные опыты по выживанию чумного микроба в почве / Н.В. Васильев // Особо опасные инф. на Кавказе: Матер. II научн.конф. – Ставрополь, 1970. – С.64–65. – Текст: непосредственный.
11. Величко, Л.Н. Экскременты блох – естественная среда долговременного хранения микроба чумы / Л.Н. Величко, К.И. Кондрашкина, А.П. Ермилов [и др.] // Проблемы особоопасн. инф. – 1978. – Вып. 6(64). – С. 51–53. – Текст: непосредственный.
12. Вержуцкий, Д.Б. Природные очаги чумы в Монголии: аннотированный список / Д.Б. Вержуцкий, З. Адъясурэн // Байкальский зоологический журнал. – 2019. – № 2(25). – С. 92–103. – Текст: непосредственный.
13. Видяева, Н.А. Формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *Caenorhabditis elegans* / Н.А. Видяева, Г.А. Ерошенко, Н.Ю. Шавина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 1(99). – С. 31–34. – Текст: непосредственный. –[https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-1\(99\)-31-34](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-1(99)-31-34).
14. Гагарин, В.Г. Свободноживущие нематоды пресных вод России и сопредельных стран: фауна, и пути её формирования, экология, таксономия, филогения / В.Г. Гагарин // М.: «Наука». – 2001. – 168 с. – Текст: непосредственный.
15. Домарадский, И.В. Некоторые проблемы адаптации патогенных бактерий к окружающей среде / И.В. Домарадский // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1997. – № 4. – С. 31–35. – Текст: непосредственный.
16. Дятлов, А.И. Обоснование гипотезы непаразитарного механизма природной очаговости чумы / А.И. Дятлов // Ставрополь, 1982. - С. 2-16. (Деп.ВИНИТИ, №6299-82). – Текст: непосредственный.
17. Ерошенко, Г.А. Структурный анализ генов, участвующих в ферментации мелибиозы и продукции изоцитралиазы у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов / Г.А. Ерошенко, Г.Н. Одинокоев, Л.М. Куклева [и др.] // Генетика. – 2011. – № 47. – С. 44–50. – Текст: непосредственный.

18. Ерошенко, Г.А. Изучение образования биопленки у беспигментных и бесплазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo* / Г.А. Ерошенко, Н.А. Видяева, Л.М. Куклева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 3(113). – С. 45–49. – Текст: непосредственный.
19. Ерошенко, Г.А. Генетические основы variability признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis* / Г.А. Ерошенко, Г.Н. Одинокоев, Л.М. Куклева [и др.] // Генетика. – 2014. – V. 50, № 5. – С. 453–460. – Текст: непосредственный.
20. Ерошенко, Г.А. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств / Г.А. Ерошенко, Я.М. Краснов, Н.Ю. Носов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 58–64. – Текст: непосредственный. – doi:10.21055/0370–1069–2015–4–58–64.
21. Ерошенко, Г.А. Характеристика энтомопаразитических нематод блох мелких грызунов / Г.А. Ерошенко, Е.И. Кошель, А.М. Поршаков [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 32–37. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2016–3–32–37>.
22. Ерошенко, Г.А. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае / Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Краснов Я.М. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 2. – С. 49–56. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2018–2–49–56>.
23. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;(4):14–22. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2022–4–14–22>.
24. Ерошенко, Г.А. Палеогеномика возбудителя чумы и перспективы палеогеномных исследований на территории России / Г.А. Ерошенко, Е.Ф. Батиева, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 2. – С. 13–28. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2023–2–13–28>
25. Зыкин, Л.Ф. Л-формы возбудителей инфекционных заболеваний в связи с проблемой персистенции / Л.Ф. Зыкин, Г.С. Дунаев // Современ. аспекты профилактик. зоонозн. инф. – 1984. – Ч. 1. – С. 130–132. – Текст: непосредственный.

26. Иофф, И.Г. Высокогорный природный очаг чумы в Киргизии / И.Г. Иофф, Н.П. Наумов, С.С. Фолитарек, Ф.И. Абрамов // Природноочагов. трансмиссивн. болезни в Казахстане. – Алма-Ата. – 1951. – С. 173–324. – Текст: непосредственный.
27. Калабухов, Н.И. Явление длительных перерывов эпизоотической активности природных очагов чумы и его вероятные причины / Н.И. Калабухов // Зоол. журн. – 1969. – Т. XLVIII, Вып. 2. – С. 165–178. – Текст: непосредственный.
28. Козлов, М.П. Влияние нематод *Aphanitylenchus sp.* на репродуктивную способность блох *Ceratophyllus consimilis* / М.П. Козлов, И.В. Чумакова, А.М. Белокопытова // Паразитология. – 1985. – № 19(5). С. 407–409. – Текст: непосредственный.
29. Кондрашкина, К.И. Долговременное хранение микроба чумы в экскрементах блох / К.И. Кондрашкина, А.П. Ермилов, Л.Н. Величко, А.Д. Лукьянова // Проблемы особо опасн. инф. – 1976. – Вып. 2(48). – С. 44–47. – Текст: непосредственный.
30. Кондрашкина, К.И. К вопросу о закономерностях существования микроба чумы в межэпизоотическое время (обзор) / К.И. Кондрашкина, А.П. Ермилов, Л.Н. Величко [и др.] // Проблемы особо опасн. инф. – 1976. – Вып. 2(48). – С. 5–9. – Текст: непосредственный.
31. Корзун, В.М. Монгольская часть трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2017 г. Сообщение 1. Эпизоотическая ситуация. / В.М. Корзун, С.В. Балахонов, А.В. Денисов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 79–84. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-79-84>.
32. Кошель, Е.И. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона / Е.И. Кошель, Л.В. Анисимова, Л.А. Новичкова [и др.] // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 39–45. – Текст: непосредственный. – doi: 10.7868/S0016675815010051.
33. Кошель, Е.И. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba sp.* в экспериментальных условиях / Е.И. Кошель, Г.А. Ерошенко, Л.В. Анисимова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 2. – С. 69–74. – Текст: непосредственный. – doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
34. Краминский, В.А. О механизме возникновения и эпизоотологическом значении слабовирулентных штаммов чумного микроба / В.А. Краминский, И.В. Домарадский // Докл. Иркут. н-и. противочум. ин-та. – 1961. – Вып. 1. – С. 11–14. – Текст: непосредственный.

35. Куклева, Л.М. Изучение вариабельности нуклеотидной последовательности генов *gha* локуса у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов / Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.Е. Куклев [и др.] // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2008. – № 2. – С. 23–27. – Текст: непосредственный.
36. Куклева, Л.М. Сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и генетические причины их ауксотрофности / Л.М. Куклева, Г.Н. Одинокоев, Н.Ю. Шавина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 2. – С. 33–36. – Текст: непосредственный – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-2-33-36>.
37. Куклева, Л.М. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* из Забайкальскогостепного очага чумы / Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, Н.А. Виноградова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 44–48. – Текст: непосредственный.
38. Куклева, Л. М. Анализ разнообразия и определение геновариантов штаммов возбудителя чумы из очагов Монголии / Л. М. Куклева, Н.Ю. Шавина, Г.Н. Одинокоев [и др.] // Генетика. – 2015. – № 1. – С. 298–305. – Текст: непосредственный.
39. Куклева, Л.М. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. / Л.М. Куклева, А.К. Джапарова, Е.Г. Оглодин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – Вып. 2. – С. 114–122. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-114-122>.
40. Кутырев, В.В. Плазмиды патогенности чумного микроба / В.В. Кутырев, Ю.А. Попов, О.А. Проценко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1986. – № 6. – С. 3–11. – Текст: непосредственный.
41. Кутырев, В.В. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными / В.В. Кутырев, Г.А. Ерошенко, Н.В. Попов [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009. – № 4. – С. 6–13. – Текст: непосредственный.
42. Кутырев, В.В. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно–Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы / В.В. Кутырев, А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова [и др.] // Проблемы особо

- опасных инфекций. – 2014. – № 4. – С. 9–16. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-4-9-16>.
43. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН В.В. Кутырева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с. – Текст: непосредственный.
44. Ларина, В.С. О выделении чумного микроба от почвенных микроорганизмов в Волго-Уральском степном очаге / В.С. Ларина // Организация эpidнадзора при чуме и меры ее профилактикт. – Алма-Ата, 1992. – С. 113–116. – Текст: непосредственный.
45. Литвин, В.Ю. О вероятном механизме поддержания вирулентности бактерий в почвенных и водных сообществах / В.Ю. Литвин, В.И. Пушкарева // В кн. Патогенные бактерии в сообществах (механизмы и формы существования): сб. науч. тр. М.: Росагросервис. – 1994. – С. 24–34. – Текст: непосредственный.
46. Литвин, В.Ю. Природный очаг инфекции как экологическая система: специальность 03.07.07 «Микробиология»: автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора медицинских наук. / Литвин Виктор Юрьевич. – Москва, 1979. – 40 с. – Текст: непосредственный.
47. Литвин, В.Ю. Сапронозные аспекты энзоотии чумы / В.Ю. Литвин // Усп. Совр. Биологии. – 2003. – № 123(6). – С. 543–552. – Текст: непосредственный.
48. Литвин, В.Ю. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.И. Пушкарева [и др.] // М.: Фармус-Принт. – 1997. – 256 с. – Текст: непосредственный.
49. Наумов, Н.П. Условия существования и важнейшие эпизоотологические особенности Приаральского участка Среднеазиатского равнинного природного очага чумы / Н.П. Наумов, А.А. Жучаев, С.Н. Варшавский [и др.] // Природн. очагов. и эпидемиол. особо опасн. инф. заболеваний. – Саратов. – 1959. – С. 65–84. – Текст: непосредственный.
50. Никульшин, С.В. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте / С.В. Никульшин, Т.Г. Онацкая, Л.М. Луканина // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. – 1992. – № 9(10). – С. 2–4. – Текст: непосредственный.
51. Оглодин, Е.Г. Видовая принадлежность, численность и динамика взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммами *Yersinia pestis* / Е.Г. Оглодин, О.А. Морозов, К.А. Никифоров [и др.] // Проблемы особо опасных

- инфекций. – 2017. – Вып. 4. – С. 56–61. – Текст: непосредственный. – doi: 10.21055/0370–1069–2017–4–56–61.
52. Оглодин, Е.Г. Систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод, выделенных от блох в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы / Е.Г. Оглодин, Е.Г. Токмакова, К.А. Никифоров, А.В. Денисов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Вып. 2. – С. 79–83. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2018–2–79–83>.
53. Оглодин, Е.Г. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России / Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 82–85. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370–1069–2015–4–82–85>.
54. Одинокоев, Г.Н. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов / Г.Н. Одинокоев, Г.А. Ерошенко, Я.М. Краснов [и др.] // Генетика. – 2011. – Т. 47(3). – Р. 332–338. – Текст: непосредственный.
55. Онищенко, Г.Г. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2004. – 192 с. – Текст: непосредственный.
56. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569–09. – М., 2010. – Текст: непосредственный.
57. Попов, Н.В. К роли нематод [*Secernentae, Rhabdidae*] – паразитов блох в энзоотии чумы / Н.В. Попов, А.А. Слудский, А.И. Удовиков [и др.] // Энтотомол. и паразитол. исследования в Поволжье. – 2006. – № 5. – С. 88–93. – Текст: непосредственный.
58. Попов, Н.В. Оценка возможной роли каменки-плясуньи (*Oenanthe isabellina*) и других птиц в механизме энзоотии чумы / Н.В. Попов, А.А. Слудский, Е.В. Завьялов [и др.] // Поволжский экологический журнал. – 2007. – № 3. – С. 215–226. – Текст: непосредственный.
59. Попов, Н.В. Роль биопленок *Yersinia pestis* в механизме энзоотий чумы / Н.В. Попов, А.А. Слудский, А.И. Удовиков [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол. – 2008. – № 4. – С. 118–120. – Текст: непосредственный.

60. Попов, Н.В. Совершенствование эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2022 г. / Н.В. Попов, И.Г. Карнаухов, А.А. Кузнецов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 1. – С. 35–42. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-35-42>.
61. Попов, Н.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в мире. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2024 г. / Н.В. Попов, И.Г. Карнаухов, А.А. Кузнецов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. – № 1. – С. 67–75. – Текст: непосредственный. – DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-67-75.
62. Попов, Ю.А. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле / Ю.А. Попов, О.А. Проценко, П.И. Анисимов, А.М. Кокушкин, О.Т. Можаров // Профилактика особо опасных инфекций. – 1980. – С. 20–25. – Текст: непосредственный.
63. Попова, А.Ю. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств / А.Ю. Попова, В.В. Кутырев // Калининград: РА Полиграфычъ. – 2022. – 348 с. – Текст: непосредственный.
64. Попова, А.Ю. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно–Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. / А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, С.В. Балахонов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 4. – С. 5–10. – Текст: непосредственный. – doi.10.21055/0370-1069-2016-4-5-10.
65. Проценко, О.А. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракция I и экзотоксина «мышинного» токсина / О.А. Проценко, П.И. Анисимов, О.Т. Можаров [и др.] // Генетика. – 1983. – Т. 19, № 7. – С. 1081–1090. – Текст: непосредственный.
66. Пушкарева, В.И. Экспериментальная оценка взаимодействия *Yersinia pestis* EV с почвенными инфузориями и возможности длительного сохранения бактерий в цистах простейших / В.И. Пушкарева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 4. – С. 40–44. – Текст: непосредственный.
67. Рубцов, И.А. Паразиты и враги блох / И.А. Рубцов // Л.: Наука. – 1981. – 99 с. – Текст: непосредственный.

68. Свиридов, Г.Г. Опыт изучения проблемы сохранения возбудителя чумы в неэпизоотические годы с помощью искусственно изолированных нор / Г.Г. Свиридов, И.Б. Першин, Г.С. Новиков [и др.] // Пробл. природн. очаг. чумы: Тез. докл. конф. – Иркутск, 1980. – Ч.2. – С. 24–25. – Текст: непосредственный.
69. Слободянюк, О.В. Обоснование рода *Rubzovinema* gen.n. (Sphaerularioidea) и переописания *Rubzovinema ceratophylla* comb.n. паразита блохи *Citellophillus tesquorum* / О.В. Слободянюк // Зоологический журнал. – 1991. – Т. 70, № 9. – С. 33–43. – Текст: непосредственный.
70. Слудский, А.А. Эпизоотология чумы (обзор исследований и гипотез) Часть 2 / А.А.Слудский // Саратов, 2014. – 182 с. (Деп. в ВИНТИ № 232-В 2014) – Текст: непосредственный.
71. Сучков, Ю.Г. «Видит око да зуб неймет» («Некультивируемые» формы возбудителя чумы) / Ю.Г. Сучков, М.И. Леви // Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочумн. системы России и Сов. Союза. – М.: «Информатика», 1997. – Вып. 5. – С. 131–140. – Текст: непосредственный.
72. Сущук, А.А. Сообщества почвенных нематод типичных биоценозов Республики Алтай / А.А. Сущук, Е.М. Матвеева, Д.С. Калинкина, М.Г. Юркевич // Зоологический журнал. – 2022. – № 101(10). – Р. 1083–1095. – Текст: непосредственный. – doi: 10.31857/S0044513422100129.
73. Тимофеева, Л.А. Итоги экспериментального изучения роли почвы в сохранении и передаче чумного микроба / Л.А. Тимофеева, В.Я. Головачева // Состояние и перспективы профилактики чумы: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1978. – С.21–22. – Текст: непосредственный.
74. Тимофеева, Л.А. Новые данные о сохранении чумного микроба в почве, взятой из нор грызунов / Л.А. Тимофеева, В.Я. Головачева // Докл. Иркут. противочум. ин-та. – Чита, 1974. – С. 101–103. – Текст: непосредственный.
75. Тимофеева, Л.А. Роль почвы в сохранении чумного микроба / Л.А. Тимофеева, В.Я. Головачева, Л.А. Смирнова, Н.В. Олькова // Докл. Иркут. противочум. ин-та. – Кызыл, 1969. – С. 64–66. – Текст: непосредственный.
76. Тимофеева, Л.А. Сохранение чумного микроба в почве, взятой из нор грызунов / Л.А. Тимофеева, В.Я. Головачева, Л.А. Смирнова // Докл. Иркут. противочумн. ин-та. – Кызыл, 1966. – С. 46–48. – Текст: непосредственный.

77. Тимофеева, Л.А. Экспериментальное изучение роли почвы в сохранении и передаче чумного микроба / Л.А. Тимофеева, В.Я. Головачева // Проблемы особо опасн. инф. – 1975. – Вып. 1. – С. 161–165. – Текст: непосредственный.
78. Токмакова, Е.Г. Зараженность блох длиннохвостого суслика энтомопаразитическими нематодами в Тувинском горном природном очаге чумы / Е.Г. Токмакова, Н.Ф. Галацевич, Л.П. Базанова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – Вып. (4). – С. 96–101. – Текст: непосредственный. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-96-101>.
79. Федоров, В.Н. К вопросу о механизме сохранения чумного микроба в межэпизоотические сезоны / В.Н. Федоров // Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. Сб. научн. тр., посвящ. 25-летию ин-та "Микроб". Саратов, 1944. – С. 2739. – Текст: непосредственный.
80. Фенюк, Б.К. Экологические факторы очаговости и эпизоотологии чумы грызунов. Значение второстепенных носителей чумы / Б.К. Фенюк // Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. Сб. научн. тр., посвящ. 25-летию ин-та "Микроб". Саратов, 1948. – С. 37–50. – Текст: непосредственный.
81. Хаусман, К. Протистология: руководство / К. Хаусман, Н. Хюльсман, Р. Радек // М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2010. – 495 с. – Текст: непосредственный.
82. Черкасский, Б. Л. Инфекционные и паразитарные болезни человека / Б. Л. Черкасский. – М.: Изд-во «Медицинская газета». – 1994. – 617 с. – Текст: непосредственный.
83. Шевченко, В.Л. О механизме сохранения природной очаговости чумы в Волго-Уральских песках / В.Л. Шевченко, В.И. Каймашников, Т.А. Андреева // Зоол.журн. – 1969. – Т. XLIII, Вып. 2. – С. 270–283. – Текст: непосредственный.
84. Шевченко, В.Л. Пространственная диссеминация возбудителя чумы как один из факторов механизма энзоотии / В.Л. Шевченко // Проблемы изуч. механизма энзоотии чумы: Тез. докл. – Саратов. – 1980. – С. 85–90. – Текст: непосредственный.
85. Abd, H. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii* / H. Abd, A. Saeed, A. Weintraub [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – № 60. – P. 33–39. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.
86. Abu Hatab, M. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids / M. Abu Hatab, R. Gaugler, R.U. Ehlers // J Parasitol. – 1998. – V. 84(2). – P. 215–221. – Text: unmediated.

87. Adams, B.J. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens / B.J. Adams, A. Fodor, H.S. Koppenhöfer [et al.] // *Biological control*. – 2006. – V. 37(1). – P. 32–49. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.008>.
88. Aksozek, A. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions / A. Aksozek, K. McClellan, K. Howard [et al.] // *J Parasitol*. – 2002. – V. 88(3). – P. 621–623. – Text: unmediated. – doi: 10.1645/0022–3395(2002)088[0621:ROACCT]2.0.CO;2.
89. Al-Quadan, T. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella* / T. Al-Quadan, C.T. Price, Y. Abu Kwaik // *Trends Microbiol*. – 2012. – № 20. – P. 299–306. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.tim.2012.03.005.
90. Ambreetha, S. Pathogenesis of plant-associated *Pseudomonas aeruginosa* in *Caenorhabditis elegans* model / S. Ambreetha, D. Balachandar // *BMC Microbiol*. – 2022. – V. 22(1):269. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02682-z>.
91. Anderson, I.J. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome / I.J. Anderson, R.F. Watkins, J. Samuelson // *Protist*. – 2005. – V. 156(2). – P. 203–214. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.protis.2005.04.001.
92. Andrianaivoarimanana, V. Understanding the persistence of plague foci in Madagascar / V. Andrianaivoarimanana, K. Kreppel, N. Elissa [et al.] // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2013. – V. 7, № 11:e2382. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pntd.0002382.
93. Avery, L. Food transport in the *C. elegans* pharynx / L. Avery, B.B. Shtonda // *J. Exp. Biol*. – 2003. – V. 206. – P. 2441–2457. – Text: unmediated. – doi: 10.1242/jeb.00433.
94. Ayyadurai, S. Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil / S. Ayyadurai, L. Houhamdi, H. Lepidi [et al.] // *Microbiology*. – 2008. – V. 154(9): 2865–2871. – Text: unmediated. – doi: 10.1099/mic.0.2007/016154-0.
95. Back, M.A. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens / M.A. Back, P.P.J. Haydock, P. Jenkinson // *Plant Pathol*. – 2002. – V. 51. – P. 683–697. – Text: unmediated.
96. Bacot, A.W. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas / A.W. Bacot, C.J. Martin // *J. Hyg*. – 1914. – № 13. – P. 423–439. – Text: unmediated.
97. Baltazard, M. Study of the epidemiology of plague in Iranian Kurdistan / M. Baltazard // *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. – V. 56. – P. 1101–1102. – Text: unmediated.

98. Baquiran, J.P. Culture-independent investigation of the microbiome associated with the nematode *Acrobeloides maximus* / J.P. Baquiran, B. Thater, S. Sedky [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8(7):e67425. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pone.0067425.
99. Barker, J. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment / J. Barker, M.R. Brown // Microbiology (Reading). – 1994. – V. 140 (Pt 6). – P. 1253–1259. – Text: unmediated. – doi: 10.1099/00221287-140-6-1253. PMID: 8081490.
100. Bartra, S.S. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein / S.S. Bartra, K.L. Styer, D.M. O'Bryant [et al.] // Infect Immun. – 2008. – V. 76(2). – P. 612–622. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.01125-07.
101. Ben Salah, I. Surviving within the amoebal exocyst: the *Mycobacterium avium* complex paradigm / I. Ben Salah, M. Drancourt // BMC Microbiol. – 2010. – V. 10:99 – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-99>.
102. Benavides-Montaño, J.A. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival / J.A. Benavides-Montaño, V. Vadyvaloo // Appl. Environ. Microbiol. – 2017. – V. 83(13):e00593-17. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.00593-17.
103. Berg, M. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments / M. Berg, B. Stenuit, J. Ho [et al.] // ISME J. – 2016. – V. 10(8). – P. 1998–2009. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/ismej.2015.253.
104. Bertelli, C. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms / C. Bertelli, G. Greub // Front Cell Infect Microbiol. – 2012. – V. 2:110. – Text: unmediated. – doi: 10.3389/fcimb.2012.00110.
105. Bertherat, E. Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003 / E. Bertherat, S. Bekhoucha, S. Chougrani [et al.] // Emerging infectious diseases. – 2007. – V. 13, № 10. – P. 1459–1462. – Text: unmediated. – doi: 10.3201/eid1310.070284.
106. Blaxter, M.L. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda / M.L. Blaxter, P. De Ley, J.R. Garey [et al.] // Nature. – 1998. – V. 392(6671). – P. 71–75. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/32160.
107. Bobrov, A.G. Insight into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production / A.G. Bobrov,

- O.A. Kirillina, S. Forman [et al.] // Environ. microbiol. – 2008. – V. 10, № 6. – P. 1419–1432. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1462–2920.2007.01554.x.
108. Boegler, K.A. Evaluation of the infectiousness to mice of soil contaminated with *Yersinia pestis* infected blood / K.A. Boegler, C.B. Graham, J.A. Monteneri // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2012. – V. 12, № 11. P. 948–952. – Text: unmediated. – doi: 10.1089/vbz.2012.1031.
109. Bos, K.I. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death / K.I. Bos, V.J. Schuenemann, G.B. Golding [et al.] // Nature. – 2011. – V. 478, № 7370. – P. 506–510. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/nature10549.
110. Bozue, J.A. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion / J.A. Bozue, W. Johnson // Infect Immun. – 1996. – V. 64(2). – P. 668–673. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/iai.64.2.668–673.1996.
111. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* / S. Brenner // Genetics. – 1974. – V. 77. – P. 71–94. – Text: unmediated.
112. Brieland, J.K. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease / J.K. Brieland, J.C. Fantone, D.G. Remick [et al.] // Infect. Immun. – 1997. – № 65(12). – P. 5330–5333. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/iai.65.12.5330–5333.1997.
113. Brubaker, R.R. Interconversion of Purine Mononucleotides in *Pasteurella pestis* / R.R. Brubaker // Infect Immun. – 1970. – V. 1(5). – P. 446–454. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/iai.1.5.446–454.1970.
114. Brubaker, R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae / R.R. Brubaker // Clin Microbiol Rev. – 1991. – V. 4(3). – P. 309–324. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/CMR.4.3.309.
115. Burns–Huang, K. *Mycobacterium tuberculosis* cysteine biosynthesis genes *mec+*–*cysO*–*cysM* confer resistance to clofazimine / K. Burns–Huang, S. Mundhra // Tuberculosis (Edinb). – 2019. – V. 115. – P. 63–66. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.tube.2019.02.002.
116. Cabanel, N. Plague outbreak in Libya, 2009, unrelated to plague in Algeria / N. Cabanel, A. Leclercq, V. Chenal–Francisque [et al.] // Emerging infectious diseases. – 2013. – V. 19, № 2. – P. 230–236. – Text: unmediated. – doi: 10.3201/eid1902.121031.
117. Cairns, J. Black Queen Evolution and Trophic Interactions Determine Plasmid Survival after the Disruption of the Conjugation Network / J. Cairns, K. Koskinen, R. Penttinen [et al.]

- // mSystems. – 2018. – V. 3(5):e00104–18. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/mSystems.00104–18.
118. Carter, L.L. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential 2022–2032 / L.L. Carter, M.A. Yu, J.A. Sacks [et al.] // Bull World Health Organ. – 2022. – V.100, №4. – P. 239–239. – Text: unmediated. – doi: 10.2471/BLT.22.288220.
119. Chain, P.S. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* / P.S. Chain, E. Carniel, F.W.Larimer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V.191, № 38. – P.13826–13831. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.0404012101.
120. Charusanti, P. An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92 / P. Charusanti, S. Chauhan, K. McAteer [et al.] // BMC Syst Biol. – 2011. – V. 5. – P. 163. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/1752–0509–5–163.
121. Chouikha, I. Silencing urease: a key evolutionary step that facilitated the adaptation of *Yersinia pestis* to the flea-borne transmission route / I. Chouikha, B.J. Hinnebusch // Proc Natl Acad Sci USA. – 2014. – V. 111, № 52. – P. 18709–18714. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.1413209111.
122. Cirillo, J.D. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion / J.D. Cirillo, S. Falkow, L.S. Tompkins // Infect. Immun. – 1994. – № 62. – P. 3254–3261. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/iai.62.8.3254–3261.1994.
123. Conchas, R.F. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia* / R.F. Conchas, E. Carniel // Gene. – 1990. – V. 87(1). – P. 133–137. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/0378–1119(90)90505–L.
124. Connor, M.G. *Yersinia pestis* Requires Host Rab1b for Survival in Macrophages / M.G. Connor, A.R. Pulsifer, C.T. Price [et al.] // PLoS Pathog. – 2015. – V. 11(10):e1005241. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.ppat.1005241.
125. Cui, Y. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis* / Y. Cui, C. Yu, Y. Yan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110, №.2. – P. 577–582. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.1205750110 PMID: 23271803.
126. Damgaard, P.B. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. Nature / P.B. Damgaard, N. Marchi, S. Rasmussen [et al.] // Erratum in: Nature. – 2018. – V. 557, № 7705. P. 369–374. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/s41586–018–0094–2.

127. Darby, C. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake / C. Darby, J.W. Hsu, N. Ghori [et al.] // Nature. – 2002. – V. 417. – P. 243–244. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/417243a.
128. Darby, C. Identification of gmhA a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm / C. Darby, S.L. Ananth, L. Tan // Infect. Immun. – 2005. – V. 73, № 11. – P. 7236–7242. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.73.11.7236–7242.2005.
129. Darby, C. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to attachment of *Yersinia* biofilms / C. Darby, A. Chakraborti, S.M. Politz [et al.] // Genetic. – 2007. – V. 176.–P. 221–230. – Text: unmediated. – doi: 10.1534/genetics.106.067496.
130. Davis, S. Predictive Thresholds for Plague in Kazakhstan / S. Davis, M. Begon, L. De Bruyn // Science – 2004. – V. 304, № 5671. – P. 736–738. – Text: unmediated. – doi: 10.1126/science.1095854.
131. Deng, W. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM / W. Deng, V. Burland, G. Plunkett [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. – V.184 – P. 4601–4611. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/JB.184.16.4601–4611.2002.
132. Deutch, S. Broad-range real time PCR and DNA sequencing for the diagnosis of bacterial meningitis / S. Deutch, L.N. Pedersen, L. Pødenphant [et al.] // Scand J Infect Dis. – 2006. – V. 38(1). – P. 27–35. – Text: unmediated. – doi: 10.1080/00365540500372861.
133. Dey, R. Role of amoebae for survival and recovery of 'non-culturable' *Helicobacter pylori* cells in aquatic environments / R. Dey, A. Rieger, G. Banting, N.J. Ashbolt // FEMS Microbiol Ecol. – 2020. – V. 96(10):fiae182. – Text: unmediated. – doi: 10.1093/femsec/fiae182.
134. Diehl, M.L.N. Genotype distribution of *Acanthamoeba* in keratitis: a systematic review / M.L.N. Diehl, J. Paes, M.B. Rott // Parasitol Res. – 2021. – V. 120(9). – P. 3051–3063. – Text: unmediated. – doi: 10.1007/s00436–021–07261–1.
135. Dirksen, P. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model / P. Dirksen, S.A. Marsh, I. Braker [et al.] // BMC Biol. – 2016. – V. 14. – P. 38. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/s12915–016–0258–1.
136. Dubyanskiy, V.M. Ecology of *Yersinia pestis* and the Epidemiology of Plague / V.M. Dubyanskiy, A.B. Yeszhanov // Adv Exp Med Biol. – 2016. – V. 918. – P. 101–170. – Text: unmediated. – doi: 10.1007/978–94–024–0890–4_5.

137. Duchaud, E. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* / E. Duchaud, C. Rusniok, L. Frangeul [et al.] // Nat Biotechnol. – 2003. – V. 21(11). – P. 1307–1313. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/nbt886.
138. Dudzic, J.P. A highly divergent Wolbachia with a tiny genome in an insect-parasitic tylenchid nematode / J.P. Dudzic, C.I. Curtis, B.E. Gowen, S.J. Perlman // Proc Biol Sci. – 2022. – V. 289(1983):20221518. – Text: unmediated. – doi: 10.1098/rspb.2022.1518.
139. Eisen, R.J. Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods / R.J. Eisen, K.L. Gage // Vet Res. – 2009. – V. 40, № 2:1. – Text: unmediated. – doi: 10.1051/vetres:2008039.
140. Eisen, R.J. Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions / R.J. Eisen, J.M. Petersen, M.S. Higgins [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2008. – V. 14. – P. 941–943. – Text: unmediated. – doi: 10.3201/eid1406.080029.
141. Ekelund, F. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology / F. Ekelund, R. Rønn // FEMS Microbiol. – 1994. – V. 15(4). – P. 321–353. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1574–6976.1994.tb00144.x.
142. El-Etr, S.H. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection / S.H. El-Etr, J.J. Margolis, D. Monack [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2009. – V. 75(23). – P. 7488–7500. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.01829–09.
143. Erickson, D.L. Acute oral toxicity of *Yersinia pseudotuberculosis* to fleas: implications for the evolution of vector-borne transmission of plague / D.L. Erickson, N.R. Waterfield, V. Vadyvaloo // Cell Microbiol. – 2007. – V. 9, № 11. – P. 2658–66. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1462–5822.2007.00986.x.
144. Erickson, D.L. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis* / D.L. Erickson, C.O. Jarrett, B.W. Wren // J Bacteriol. – 2006. – V. 188, №3. – P. 1113–1119. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/JB.188.3.1113–1119.2006.
145. Eroshenko, G.A. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries / G.A. Eroshenko, N.V. Popov, Z.V. Al'khova [et al.] // PLoS One. – 2021. – V. 16, № 2:e0244615. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pone.0244615.

146. Eroshenko, G.A. Phylogeny and ecology of *Yersinia pestis* strains from plague foci of the Russian Federation and other CIS countries / G.A. Eroshenko, V.V. Kuttyrev // The international conference on plague prevention and control, collection of abstracts – Harbin, 2018. – P. 13. – Text: unmediated.
147. Eroshenko, G.A. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch O.ANT are widely spread in the high–mountain plague foci of Kyrgyzstan / G.A. Eroshenko, N.Y. Nosov, Y.M. Krasnov [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – V. 12, № 10: e0187230. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187230>
148. Essig, A. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumonia* / A. Essig, M. Heinemann, U. Simnacher, R. Marre // Appl Environ Microbiol. – 1997. – V. 63(4). – P. 1396–1369. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/aem.63.4.1396–1399.1997.
149. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – V. 39(4). – P. 783–791. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1558–5646.1985.tb00420.x.
150. Gage, K.L. Natural history of plague: perspective from more than a century of research / K.L. Gage, M.Y. Kosoy // Annu. Rev. Entomol. – 2005. – V. 50. – P.505–528. – Text: unmediated. – doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.
151. Gao, X. Altered *Yersinia pestis* virulence is associated with the small regulatory RNA HmsA encoded on the plasmid pPCP1 [Text] / X. Gao, M. Wang, Z. Liu [et al.] // Future Microbiol. – 2020. – № 15. – P. 1207–1215. – Text: unmediated. – doi: 10.2217/fmb–2019–0319.
152. Gengler, S. Long–term persistence of *Yersinia pseudotuberculosis* in entomopathogenic nematodes / S. Gengler, A. Laudisoit, H. Batoko, P. Wattiau // PLoS One. – 2015. – V. 10(1):e0116818. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pone.0116818.
153. Gomez-Valero, L. Genome dynamics in Legionella: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication / L. Gomez-Valero, C. Buchrieser // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2013. – V. 3(6):a009993. – Text: unmediated. – doi: 10.1101/cshperspect.a009993.
154. Goodrich-Blair, H. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination / H. Goodrich-Blair, D.J. Clarke // Mol Microbiol. – 2007. – V. 64(2). – P. 260–268. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1365–2958.2007.05671.x.

155. Green, M. Placer l'Afrique sur la carte de la peste noire: apports de la génétique et de l'histoire / M. Green // *Africas*. – 2018. – № 9:e2125. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.4000/afriques.2125>.
156. Greub, G. Microorganisms resistant to free-living amoebae / G. Greub, D. Raoult // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – № 17. – P. 413–433. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/CMR.17.2.413–433.2004.
157. Guédon, E. Cysteine Metabolism and Its Regulation in Bacteria / E. Guédon, I. Martin–Verstraete // In: Wendisch, V.F. (eds) *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering. Microbiology Monographs*. – 2006. – V. 5. – P. 195–218. – Text: unmediated. – https://doi.org/10.1007/7171_2006_060.
158. Han, Y. Comparative transcriptomics in *Yersinia pestis*: a global view of environmental modulation of gene expression / Y. Han, J. Qiu, Z. Guo [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2007. – V. 7. – P. 96. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/1471–2180–7–96.
159. Harb, O.S. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens / O.S. Harb, L.Y. Gao, Y. Abu Kwaik // *Environ Microbiol.* – 2000. – V. 2(3). – P. 251–265. – Text: unmediated. – doi: 10.1046/j.1462–2920.2000.00112.x.
160. Harbeck, M. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6(th) century AD reveals insights into Justinianic Plague [Text] / M. Harbeck, L. Seifert, S. Hänsch [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9, № 5:e1003349. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.ppat.1003349.
161. Hausner, M. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis / M. Hausner, S. Wuertz // *Appl Environ Microbiol.* – 1999. – V. 65(8). – P. 3710–3713. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.65.8.3710–3713.1999.
162. Heisch, R.B. Results of a plague investigation in Kenya / R.B. Heisch, W.E. Grainger, J. D'Souza // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 1953. – V. 47, № 6. – P. 503–521. – Text: unmediated.
163. Herlemann, D.P. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea / D.P. Herlemann, M. Labrenz, K. Jürgens [et al.] // *ISME J.* – 2011. – V. 5(10). – P. 1571–1579. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/ismej.2011.41.
164. Herrmann, M. *Sudhausia aristotokia* n. gen., n. sp. and *S. crassa* n. gen., n. sp. (Nematoda: Diplogastridae): viviparous new species with precocious gonad development / M. Herrmann,

- E.J. Ragsdale, N. Kanzaki, R.J. Sommer // *Nematology*. – 2013. – V. 15(8). – P. 1001–1020. – Text: unmediated. – doi:10.1163/15685411–00002738.
165. Hinnebusch, B.J. High–frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut / B.J. Hinnebusch, M.L. Rosso, T.G. Schwan, E. Carniel // *Mol Microbiol*. – 2002. – V. 46(2). – P. 349–354. – Text: unmediated. – doi: 10.1046/j.1365–2958.2002.03159.x.
166. Hinnebusch, B.J. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector / B.J. Hinnebusch, A.E. Rudolph, P. Cherepanov [et al.] // *Science*. – 2002. – V. 296, № 5568. – P. 733–735. – Text: unmediated. – doi: 10.1126/science.1069972.
167. Hinnebusch, B.J. Ecological Opportunity, Evolution, and the Emergence of Flea-Borne Plague / B.J. Hinnebusch, I. Chouikha, Y.C. Sun // *Infect Immun*. – 2016. – V. 84, № 7. – P. 1932–1940. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.00188–16.
168. Holterman, M. Nematodes as evolutionary commuters between marine, freshwater and terrestrial habitats / M. Holterman, M. Schratzberger, J. Helder // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2019. – V. 128(3). – p. 756–767. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz107>.
169. Huang, X.Z. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen / X.Z. Huang, L.E. Lindler // *Infect. Immun*. – 2004. – № 72. – P. 7212–7219. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.72.12.7212–7219.2004.
170. Huws, S.A. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities / S.A. Huws, A.J. McBain, P. Gilbert // *J Appl Microbiol*. – 2005. – V. 98(1). – P. 238–244. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1365–2672.2004.02449.x.
171. Jang, J. Probable role of *Cutibacterium acnes* in the gut of the polychaete *Capitella teleta* / J. Jang, V.E. Forbes, M.J. Sadowsky // *Sci Total Environ*. – 2022. – V. 809:151127. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151127.
172. Jarett, C.O. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector / C.O. Jarett, E. Deak, K.E. Isherwood [et al.] // *J. Infect. Dis*. – 2004. – V. 190. – P.783–792. – Text: unmediated. – doi: 10.1086/422695.
173. Jia, K. Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance / K. Jia, C. Thomas, M. Akbar [et al.] // *Proc*

- Natl Acad Sci USA. – 2009. – V. 106(34). – P. 14564–14569. – Text: unmediated. – doi:10.1073/pnas.0813319106.
174. Johnson, M. NCBI BLAST: a better web interface / M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis [*et al.*] // Nucleic Acids Res. – 2008. – V.36(Web Server issue):W5–9. – Text: unmediated. – doi: 10.1093/nar/gkn201.
175. Jones, R. *Yersinia pestis* infection and laboratory conditions alter flea-associated bacterial communities / R. Jones, S. Vetter, J. Montenieiri [*et al.*] // ISME J. – 2013. – V. 7. – P. 224–228. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.95>.
176. Jones, R.T. Bacterial communities of Bartonella-positive fleas: diversity and community assembly patterns / R.T. Jones, K.F. McCormick, A.P. Martin // Appl Environ Microbiol. – 2008. – V. 74(5). – P. 1667–1670. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.02090–07.
177. Jones, R.T. Bacterial communities of disease vectors sampled across time, space, and species / R.T. Jones, R. Knight, A.P. Martin // ISME J. – 2010. – V. 4(2). – P. 223–231. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/ismej.2009.111.
178. Jones, R.T. Interactions among symbionts of Oropsylla spp. (Siphonoptera: Ceratophyllidae) / R.T. Jones, S.A. Bernhardt, A.P. Martin, K.L. Gage // J Med Entomol. – 2012. – V. 49(3). – P. 492–496. – Text: unmediated. – doi: 10.1603/me11244.
179. Joshua, G.W. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia infection*: biofilm formation on a biotic surface / G.W. Joshua, A.V. Karlyshev, M.P. Smith [*et al.*] // Microbiology. – 2003. – № 149. – P. 3221–3229. – Text: unmediated. – doi: 10.1099/mic.0.26475–0.
180. Jousset, A. (2008) Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria / A. Jousset, S. Scheu, M. Bonkowski // Funct. Ecol. – 2008. – V. 22. – P. 714–719. – Text: unmediated.
181. Kado, C.I. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C.I. Kado, S.T. Liu // J. Bacteriol. – 1981. – V. 145(3). – P. 1365–1373. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/jb.145.3.1365–1373.1981.
182. Kanzaki, N. *Sudhausia floridensis* n. sp. (Nematoda: Diplogastridae) isolated from *Onthophagus tuberculifrons* (Coleoptera: Scarabaeidae) from Florida, USA / N. Kanzaki, R.M. Giblin–Davis, R. Gonzalez [*et al.*] // Nematology. – 2017. – V. 19. – P. 575–586. – Text: unmediated. – doi:10.1163/15685411–00002738.

183. Karimi, Y. Conservation naturelle de la peste dans le sol / Y. Karimi // Bull. Soc. Pathol. Exotique . – 1963. – V. 56. – P. 1183–1186. – Text: unmediated.
184. Kausrud, K.L. Climatically driven synchrony of gerbil populations allows large-scale plague outbreaks / K.L. Kausrud, H. Viljugrein, A. Frigessi [et al.] // Proc Biol Sci. – 2007. – V. 274, № 1621. – P. 1963–1969. – Text: unmediated. – doi: 10.1098/rspb.2007.0568.
185. Ke, Y. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell / Y. Ke, Z. Chen, R. Yang // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2013. – № 3. – P. 106. – Text: unmediated. – doi: 10.3389/fcimb.2013.00106.
186. Kennedy, G.M. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii* / G.M. Kennedy, J.H. Morisaki, P.A. Champion // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – № 78(6). P. 2049–2052. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.06965–11.
187. Kessin, R.H. Dictyostelium evolution, cell biology, and the development of multicellularity / R.H. Kessin // Cambridge University Press, New York, N.Y. – 2001. – Text: unmediated. – doi:10.1017/CBO9780511525315.
188. König, H. Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates / H. König, A. Varma // Springer Berlin, Heidelberg. – 2006. – 484 P. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1007/3-540-28185-1>.
189. Koshel, E.I. Phylogenetic analysis of entomoparasitic nematodes, potential control agents of flea populations in natural foci of plague / E.I. Koshel, V.V. Aleshin, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev // Biomed Res Int. – 2014. – V. 2014:135218. – Text: unmediated. – doi: 10.1155/2014/135218.
190. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Mol Biol Evol. – 2016. – V. 33(7). – P. 1870–1874. – Text: unmediated. – doi: 10.1093/molbev/msw054.
191. Kutyrev, V.V. Modern view on the Problems of ecology of the plague agent / V.V. Kutyrev, E.G. Oglodin, G.A. Eroshenko [et al.] // Proceeding of the International Symposium “Yersinia 14” (September 26–28, 2022. Saint-Petersburg, Russian Federation). – Saratov: Amirit. – 2022. – P. 45. – Text: unmediated.
192. Kutyrev, V.V. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States / V.V. Kutyrev, G.A. Eroshenko,

- V.L. Motin [et al.] // Front. Microbiol. – 2018. – № 9:1106. – Text: unmediated. – doi: 10.3389/fmicb.2018.01106.
193. La Scola, B. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii* / B. La Scola, D. Raoult // Clin Microbiol Infect. – 2001. – V. 7(2). – P. 75–79. – Text: unmediated. – doi: 10.1046/j.1469–0691.2001.00193.x.
194. Lancaster, J. A peek into the microbiome of two free–living aquatic nematodes *Anticoma* & *Daptonema* / J. Lancaster, R. Frontera-Suau, E. Abebe // Nematoda. – 2018. – V.5. – Text: unmediated. – doi: 10.4322/nematoda.012018.
195. Lane, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing / D.J. Lane // In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, John Wiley and Sons, New York. – 1991. – P. 115–175. – Text: unmediated.
196. Laudisoit, A. Diversity, ecology and status of potential hosts and vectors of the plague bacillus *Yersinia pestis*. Contribution to plague epidemiology in an endemic plague focus: the Lushoto district (Tanzania) / Laudisoit A. // Thesis for: PhD in Biological Sciences. 2009. – Text: unmediated. – doi:10.13140/RG.2.2.25362.25281.
197. Levathes L. When China Ruled the Seas: The Treasure Fleet of the Dragon Throne, 1405–1433. – Oxford University Press, New York, 1996. – 252 p. – Text: unmediated.
198. Lorange, E.A. Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis* / E.A. Lorange, B.L. Race, F. Sebbane // J Infect Dis. – 2005. – V. 191, № 11. – P. 1907–1912. – Text: unmediated. – doi: 10.1086/429931.
199. Mahboob, M. Molecular phylogeny and new insight into the stomatal complexity of *Fictor platypapillata* sp. n. (Diplogastridae: Nematoda) associated with *Oniticellus cinctus* (Coleoptera: Scarabaeidae) / M. Mahboob, Q. Tahseen // Journal of Helminthology. – 2022. – V. 96:e14. – Text: unmediated. – doi:10.1017/S0022149X22000050.
200. Mahmoudi, A. Plague reservoir species throughout the world / A. Mahmoudi, B. Kryštufek, A. Sludsky [et al.] // Integr Zool. – 2021. – V. 16(6). – P. 820–833. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/1749–4877.12511.
201. Marciano-Cabral, F. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans / F. Marciano-Cabral, G. Cabral // Clin Microbiol Rev. – 2003. – V. 16(2). – P. 273–307. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/CMR.16.2.273–307.2003.

202. Markman, D. *Yersinia pestis* survival and replication in potential ameba reservoir / D. Markman, M. Antolin, R. Bowen [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2018. – V. 24(2). – P. 294–302. – Text: unmediated. – doi: 10.3201/eid2402.171065.
203. Mayer, M.G. Natural variation in *Pristionchus pacificus* dauer formation reveals cross-preference rather than self-preference of nematode dauer pheromones / M.G. Mayer, R.J. Sommer // Proc Biol Sci. – 2011. – V. 278(1719). – P. 2784–2790. – Text: unmediated. – doi: 10.1098/rspb.2010.2760.
204. Mayslich, C. *Cutibacterium acnes* as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors / C. Mayslich, P.A. Grange, N. Dupin // Microorganisms. – 2021. – V. 9(2):303. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020303>.
205. Moazezikho, A. Evidence of inhibitory effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and aqueous extracts on tomato plants infected with *Meloidogyne javanica* (Tylenchida: Heteroderidae) / A. Moazezikho, H. Charehgani, M. Abdollahi [et al.] // Egypt J Biol Pest Control. – 2020. – V. 30:15. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00217-0>.
206. Moliner C, Fournier PE, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution / C. Moliner, P.E. Fournier, D. Raoult // FEMS Microbiol Rev. – 2010. – V. 34(3). – P. 281–294. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00209.x.
207. Mollaret, H.H. La peste de foussement / H.H. Mollaret, Y. Karimi, M. Eftekhari, M. Baltazard // Bull Soc Pathol Exot. – 1963. – V. 56. – P. 1186–1193. – Text: unmediated.
208. Mollaret, H. Conservation du bacille de la peste durant 28 mois en terrier artificiel: demonstration experimentale de la conservation interepizootique de la peste dans ses foyers inveteres / H. Mollaret // C.R.Acad.Sc. – 1968. – V. 267. – P. 972–973. – Text: unmediated.
209. Molmeret, M. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens / M. Molmeret, M. Horn, M. Wagner [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2005. – V. 71(1). – P. 20–28. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.71.1.20–28.2005.
210. Morelli, G. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity / G. Morelli., Y. Song, C.J. Mazzoni [et al.] // Nat. Genet. – 2010. – V. 42, № 12. – P. 1140–1143. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/ng.705.

211. Motin, V.L. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*) / V.L. Motin, A.M. Georgescu, J.M. Elliott [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184. – № 4. – P. 1019–1027. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/jb.184.4.1019–1027.2002.
212. Nguyen, B.T. Microbial regulation of natural antibiotic resistance: Understanding the protist–bacteria interactions for evolution of soil resistome / B.T. Nguyen, Q.L. Chen, J.Z. He, H.W. Hu // Sci Total Environ. – 2020. – V.705:135882. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135882.
213. Nyirenda, S.S. Factors that precipitated human plague in Zambia from 1914 to 2014: an overview for a century (100 years) / S.S. Nyirenda, B.M. Hang’ombe, B. Kilonzo // J. Zoonotic Dis. – 2016. – № 1. – P. 1–14. – Text: unmediated.
214. Nyirenda, S.S. Molecular, serological and epidemiological observations after a suspected outbreak of plague in Nyimba, eastern Zambia / S.S. Nyirenda, B.M. Hang’ombe, B. Kilonzo [et al.] // Trop Doct. – 2017. – № 47. – P. 38–43. – Text: unmediated.
215. Ogier, J.C. Entomopathogenic nematode–associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome / J.C. Ogier, S. Pagès, M. Frayssinet, S. Gaudriault // Microbiome. – 2020. – V. 8(1):25. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/s40168–020–00800–5.
216. Oglodin, E.G. Long–term persistence of *Yersinia pestis* in soil biocenosis of plague foci / E.G. Oglodin, O.A. Morozov, M.A. Makashova [et al.] // Yersinia 13th International Symposium Antananarivo, Madagascar, 16–19 September 2019. – P. 28. – Text: unmediated.
217. Olofsson, J. *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles / J. Olofsson, D. Axelsson-Olsson, L. Brudin [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8(11):e78873. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pone.0078873.
218. Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J. Parkhill, B.W. Wren, N.R. Thomson [et al.] // Nature. – 2001. – V. 413. – P. 523–527. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/35097083.
219. Pedersen, A.L. Protozoan growth rates on secondary-metabolite-producing *Pseudomonas* spp. correlate with high-level protozoan taxonomy / A.L. Pedersen, A. Winding, A. Altenburger, F. Ekelund // FEMS Microbiol. – 2011. – V. 316(1). – P. 16–22. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1574–6968.2010.02182.x.

220. Peracino, B. Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium* / B. Peracino, A. Balest, S. Bozzaro // *J Cell Sci.* – 2010. – V. 123(Pt 23). – P. 4039–4051. – Text: unmediated. – doi:10.1242/jcs.072124.
221. Perry, R.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague [Text] / R.D. Perry, J.D. Fetherston // *Clin Microbiol.* – 1997. – V. 10. – N 1. – P. 35–66. doi: 10.1128/CMR.10.1.35.
222. Perry, R.D. A plague of fleas: survival and transmission of *Yersinia pestis* [Text] / R.D. Perry // *ASM News.* – 2003. – V. 69 (7). – P. 385 – 389.
223. Pollitzer, R. Plague studies. 1. A summary of the history and survey of the present distribution of the disease / R. Pollitzer // *Bull. World Health Organ.* – 1951. – V. 4. – P. 475–533. – Text: unmediated.
224. Prentice, M.B. *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid / M.B. Prentice, K.D. James, J. Parkhill [et al.] // *J Bacteriol.* – 2001. – V. 183(8). – P. 2586–2594. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/JB.183.8.2586–2594.2001.
225. Pujol, C. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* / C. Pujol, J.B. Bliska // *Infect. Immun.* – 2003. – № 71(10). – P. 5892–5899. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.71.10.5892–5899.2003.
226. Pukatzki, S. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum* / S. Pukatzki, R.H. Kessin, J.J. Mekalanos // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – V. 99(5). – P. 3159–3164. – Text: unmediated. – doi:10.1073/pnas.052704399.
227. Pukatzki, S. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system / S. Pukatzki, A.T. Ma, D. Sturtevant [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – V. 103(5). – P. 1528–1533. – Text: unmediated. – doi:10.1073/pnas.0510322103.
228. Putaporntip, C. Analysis of *Acanthamoeba* geno-types from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. / C. Putaporntip, N. Kuamsab, W. Nuprasert [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11. – P. 17290. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>.

229. Rae, R. Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences / R. Rae, M. Riebesell, I. Dinkelacker [et al.] // *J Exp Biol.* – 2008. – V. 211(Pt 12). – P. 1927–1936. – Text: unmediated. – doi: 10.1242/jeb.014944.
230. Raghupathi, P.K. Synergistic Interactions within a Multispecies Biofilm Enhance Individual Species Protection against Grazing by a Pelagic Protozoan / P.K. Raghupathi, W. Liu, K. Sabbe [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 8:2649. – Text: unmediated. – doi: 10.3389/fmicb.2017.02649.
231. Ramot, D. The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes / D. Ramot, B.E. Johnson, T.L. Jr. Berry [et al.] // *PLoS One.* – 2008. – V. 3(5):e2208. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pone.0002208.
232. Rasch, J. Legionella-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization / J. Rasch, S. Krüger, D. Fontvieille [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2016. – V. 306(6). – P. 443–451. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.ijmm.2016.05.012.
233. Rascovan, N. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic decline [Text] / N. Rascovan, K.G. Sjögren, K. Kristiansen [et al.] // *Cell.* – 2019. – V. 176(1–2). – P. 295–305.e10. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.005.
234. Rasmussen, S. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago / S. Rasmussen, M.E. Allentoft, K. Nielsen [et al.] // *Cell.* – 2015. – V. 163, № 3. – P. 571–582. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.cell.2015.10.009.
235. Respicio-Kingry, L.B. Two Distinct *Yersinia pestis* Populations Causing Plague among Humans in the West Nile Region of Uganda / L.B. Respicio-Kingry, B.M. Yockey, S. Acayo [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – V. 10, № 2. e0004360. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pntd.0004360.
236. Riddle, D.L. Interacting genes in nematode dauer larva formation / D.L. Riddle, M.M. Swanson, P.S. Albert // *Nature.* – 1981. – V. 290(5808). – P. 668–671. – Text: unmediated. – doi:10.1038/290668a0.
237. Romeralo, M. Molecular systematics of dictyostelids: 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer region analyses / M. Romeralo, R. Escalante, L. Sastre, C. Lado // *Eukaryot Cell.* – 2007. – V. 6(1). – P. 110–116. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/EC.00233–06.

238. Romeralo, M. A fully resolved phylogeny of the social amoebas (Dictyostelia) based on combined SSU and ITS rDNA sequences / M. Romeralo, F.W. Spiegel, S.L. Baldauf // *Protist.* – 2010. – V. 161(4). – P. 539–548. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.protis.2009.12.006.
239. Rønn, R. Interactions between bacteria, protozoa and nematodes in soil / R. Rønn, M. Vestergård, F. Ekelund // *Acta Protozool.* – 2012. – V. 51. – P. 223–235. – Text: unmediated. – doi: 10.4467/16890027AP.12.018.0764
240. Salinas, K.A. Bacterial preferences of the bacterivorous soil nematode *Cephalobus brevicauda* (Cephalobidae): Effect of bacterial type and size / K.A. Salinas, S.L. Edenborn, A.J. Sexstone, J.B. Kotcon // *Pedobiologia.* – 2007. – V. 51. – P. 55–64 – Text: unmediated.
241. Schaap, P. Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas / P. Schaap, T. Winckler, M. Nelson // *Science.* – 2006. – V. 314(5799). – P. 661–663. – Text: unmediated. – doi: 10.1126/science.1130670.
242. Schmid, B.V. Local persistence and extinction of plague in a metapopulation of great gerbil burrows, Kazakhstan / B.V. Schmid, M. Jesse, L.I. Wilschut [*et al.*] // *Epidemics.* – 2012. – V. 4, № 4. – P. 211–218. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.epidem.2012.12.003.
243. Schroeder, J.M. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge / J.M. Schroeder, G.C. Booton, J. Hay [*et al.*] // *J Clin Microbiol.* – 2001. – V. 39(5). – P. 1903–1911. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/JCM.39.5.1903–1911.2001.
244. Sebbane, F. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene / F. Sebbane, A. Devalckenaere, J. Foulon // *Infect Immun.* – 2001. – V. 69, № 1. – P. 170–176. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.69.1.170–176.2001.
245. Sebbane, F. *Yersinia pestis* Plasminogen Activator / F. Sebbane, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *Biomolecules.* – 2020. – V. 10, № 11. – P. 1554. – Text: unmediated. – doi: 10.3390/biom10111554.
246. Shatilovich, A.V. Viable Nematodes from Late Pleistocene Permafrost of the Kolyma River Lowland / A.V. Shatilovich, A.V. Tchesunov, T.V. Neretina [*et al.*] // *Dokl Biol Sci.* – 2018. – V. 480(1). – P. 100–102. – Text: unmediated. – doi: 10.1134/S0012496618030079.
247. Shatilovich, A. A novel nematode species from the Siberian permafrost shares adaptive mechanisms for cryptobiotic survival with *C. elegans* dauer larva / A. Shatilovich, V.R. Gade,

- M. Pippel [*et al.*] // PLoS Genet. – 2023. – V. 19(7):e1010798. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pgen.1010798.
248. Shi, Y. The ecology and evolution of amoeba-bacterium interactions / Y. Shi, D.C. Queller, Y. Tian [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 2021. – № 87:e01866–20. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/AEM.01866–20.
249. Singh, B.N. A method of estimating the numbers of soil Protozoa especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria / B.N. Singh // Ann. Appl. Biol. – 1946. – V. 33, № 1. – P. 112–119. – Text: unmediated. – doi: 10.1111/j.1744–7348.1946.tb06282.x.
250. Slobodyanyuk, O.V. Revision of species *Psyllotylenchus pawlowskyi* (Kurochkin, 1960) Poinar & Nelson, 1973. I. Redescription *Spillotylenchus pawlowskyi* (sensu stricto) comb.n. (Tylenchida: Allantonematidae) / O.V. Slobodyanyuk // Russian Journal of Nematology. – 1997. – № 5(2). – P. 103–112. – Text: unmediated.
251. Slobodyanyuk, O.V. Revision of species *Psyllotylenchus pawlowskyi* (Kurochkin, 1960) Poinar & Nelson, 1973. II. Description of *Kurochkinitylenchus laevicepsi* gen. n., sp. n. and *Spilotylenchinae* fam. n. / O.V. Slobodyanyuk // Russian Journal of Nematology. – 1999. – № 7(1). – P. 1–18. – Text: unmediated.
252. Slobodyanyuk, O.V. Revision of species *Psyllotylenchus pawlowskyi* (Kurochkin, 1960) Poinar & Nelson, 1973. III. Description of *Spilotylenchus chusivashkini* sp. N / O.V. Slobodyanyuk // Russian Journal of Nematology. – 2000. – № 8(1). – P. 45–56. – Text: unmediated.
253. Spyrou, M.A. Historical *Yersinia pestis* genomes reveal the european Black Death as the source of ancient and modern plague pandemics / M.A. Spyrou, R.I. Tukhbatova, M. Feldman [*et al.*] // Cell Host Microbe. – 2016. – V. 19, № 6. – P. 874–881. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.chom.2016.05.012.
254. Spyrou, M.A. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague / M.A. Spyrou, R.I. Tukhbatova, C.C. Wang [*et al.*] // Nat. Commun. – 2018. – V. 9, № 1:2234. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/s41467–018–04550–9.
255. Spyrou, M.A. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes / M.A. Spyrou, M. Keller, R.I. Tukhbatova [*et al.*] // Nat. Commun. – 2019. – V. 10, № 1:4470. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/s41467–019–12154–0.

256. Spyrou, M.A. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia / M.A. Spyrou, L. Musralina, G.A. Gneccchi Ruscone [*et al.*] // *Nature*. – 2022. – V. 606, № 7915. – P. 718–724. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/s41586-022-04800-3.
257. Stapp, P. Patterns of Extinction in Prairie Dog Metapopulations: Plague Outbreaks Follow El Niño Events / P. Stapp, M.F. Antolin, M. Ball // *Frontiers in Ecology and the Environment*. – 2004. – V. 2, № 5. – P. 235–240. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.2307/3868263>.
258. Strassmann, J.E. Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria / J.E. Strassmann, L. Shu // *PLoS Biol.* – 2017. – V. 15(5):e2002460. – Text: unmediated. – doi: 10.1371/journal.pbio.2002460.10.1371/journal.pbio.2002460.
259. Stratford, M. (1978). Variation in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii* / M. Stratford, A. Griffiths // *J. Gen. Microbiol.* – 1978. – V. 108. – P. 33–37. – Text: unmediated.
260. Styer, K.L. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors / K.L. Styer, G.W. Hopkins, S.S. Bartra [*et al.*] // *EMBO Rep.* – 2005. – V. 6(10). – P. 992–997. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/sj.embor.7400516.
261. Sun, Y.C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene / Y.C. Sun, B.J. Hinnebusch, C. Darby // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – V. 105, № 23. – P. 8097–8101. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.0803525105.
262. Sun, Y.C. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. / Y.C. Sun, C.O. Jarrett, C.F. Bosio, B.J. Hinnebusch // *Cell Host Microbe*. – 2014. – V. 15, № 5. – P. 578–586. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.chom.2014.04.003.
263. Sun, Y. Volatile Metabolites from *Brevundimonas diminuta* and Nematicidal Esters Inhibit *Meloidogyne javanica* / Y. Sun, Y. Ran, H. Yang [*et al.*] // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11(4):966. – Text: unmediated. – doi: 10.3390/microorganisms11040966.
264. Sussman, G.D. Scientists Doing History: Central Africa and the Origins of the First Plague Pandemic / G.D. Sussman // *Journal of World History*. – 2016. – № 2. – P. 325 – 354. – Text: unmediated.
265. Swanson, A.R. Global Distribution of Forest Soil Dictyostelids / A.R. Swanson, E.M. Vadell, J.C. Cavender // *Journal of Biogeography*. – 1999. – V. 26(1). – P. 133–148. – Text: unmediated.

266. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Mol Biol Evol.* – 1993. – V. 10(3). – P. 512–526. – Text: unmediated. – doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
267. Thutupalli, S. Farming and public goods production in *Caenorhabditis elegans* populations / S. Thutupalli, S. Uppaluri, G.W. Constable [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2017. – V. 114(9). – P. 2289–2294. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.1608961114.
268. Tsuru, A. Nonpathogenic *Cutibacterium acnes* Confers Host Resistance against *Staphylococcus aureus* / A. Tsuru, Y. Hamazaki, S. Tomida [et al.] // *Microbiol Spectr.* – 2021. – V. 9(2):e0056221. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/Spectrum.00562–21.
269. Turankar, R.P. Survival of *Mycobacterium leprae* and association with *Acanthamoeba* from environmental samples in the inhabitant areas of active leprosy cases: A cross sectional study from endemic pockets of Purulia, West Bengal / R.P. Turankar, M. Lavania, J. Darlong [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2019. – V. 72. – P. 199–204. – Text: unmediated. – <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.014>.
270. Turnbull, A.L. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* / A.L. Turnbull, M.G. Surette // *Res Microbiol.* – 2010. – V. 161(8). – P. 643–650. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.
271. Valtueña, A. Stone Age *Yersinia pestis* genomes shed light on the early evolution, diversity, and ecology of plague / A Valtueña, G.U. Neumann, M.A. Spyrou [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2022. – V. 119, № 17:e2116722119. – Text: unmediated. – doi: 10.1073/pnas.2116722119.
272. Valtueña, A. The Stone Age plague and its persistence in Eurasia / A. Valtueña, A. Mitnik, F.M. Key [et al.] // *Curr Biol.* – 2017. – V. 27, № 23. – P. 3683–3691. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.cub.2017.10.025.
273. Varesio, L.M. *Brucella ovis* Cysteine Biosynthesis Contributes to Peroxide Stress Survival and Fitness in the Intracellular Niche / L.M. Varesio, A. Fiebig, S. Crosson // *Infect Immun.* – 2021. – V. 89(6):e00808–20. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/IAI.00808–20.
274. Vinuesa, P. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation / P. Vinuesa, C. Silva, D. Werner, E. Martínez-Romero // *Mol Phylogenet Evol.* – 2005. – V. 34(1). – P. 29–54. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.ympev.2004.08.020.

275. Vrain, T.C. Intraspecific rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism in the *Xiphinema americanum* group / T.C. Vrain, D.A. Wakarchuk, A.C. Levesque, R.I. Hamilton // *Fundamental and Applied Nematology*. – 1992. – V. 15. – P. 563–573. – Text: unmediated.
276. Wagner, D.M. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis / D.M. Wagner, J. Klunk, M. Harbeck [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2014. – V. 14, № 4. – P. 319–326. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/S1473–3099(13)70323–2.
277. Wang, Z. Identification and biochemical characterisation of *Acanthamoeba castellanii* cysteine protease 3 / Z. Wang, D. Wu, H. Tachibana [et al.] // *Parasit Vectors*. – 2020. – V. 13(1). – P. 592. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/s13071–020–04474–8.
278. Werren, J. H. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology / J.H. Werren, L. Baldo, M.E. Clark // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 6. – P. 741–751. – Text: unmediated. – doi: 10.1038/nrmicro1969.
279. WHO guidelines for plague management: revised recommendations for the use of rapid diagnostic tests, fluoroquinolones for case management and personal protective equipment for prevention of post-mortem transmission [Internet] / Geneva: World Health Organization; 2021. – 47 c. – Text: unmediated.
280. Wilkinson, P. Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* / P. Wilkinson, N.R. Waterfield, L. Crossman [et al.] // *BMC Genomics*. – 2009. – V. 10:302. – Text: unmediated. – doi: 10.1186/1471–2164–10–302.
281. Wolf–Watz, H. Type III secretion in *Yersinia*; injectisome or not? [Text] / H. Wolf–Watz // 10th International Symposium «Yersinia 2010», October 23–27, 2010 Recife, Brazil – P. 74.
282. Wu, Y. Small Insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis* / Y. Wu, T. Hao, X. Qian [et al.] // *Microbiol. Spectr.* – 2022. – № 19:e0224221. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/spectrum.02242–21.
283. Ye, S. Biocontrol potential of *Pseudomonas rhodesiae* GC–7 against the root–knot nematode *Meloidogyne graminicola* through both antagonistic effects and induced plant resistance / S. Ye, R. Yan, X. Li [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – V. 13:1025727. – Text: unmediated. – doi: 10.3389/fmicb.2022.1025727.
284. Yeates, G.W. (1982) Nematodes and decomposition / G.W. Yeates, D.C. Coleman // In *Nematodes in Soil Ecosystems*. – University of Texas Press, Austin. – 1982. – 55–80 p. – Text: unmediated.

285. Yersin, A. Rapport sur la peste bubonique de Nhatrang (Annam) / A. Yersin // Annales de l'Institut Pasteur. – 1899. – V. 13. – P. 226–246. – Text: unmediated.
286. Yousuf, G. (2017). Descriptions of Two New Species of Fictor Paramonov, 1952 from India (Nematoda: Diplogastrina) / G. Yousuf, Mahamood // Indian journal of nematology. – 2017. – V. 47. –P. 90–99. – Text: unmediated.
287. Zhou, D. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar, microtus / D. Zhou, Z. Tong, Y. Song [et al.] // J.Bacteriol. – 2004. – V. 186. – P. 5147–5162. – Text: unmediated. – doi: 10.1128/JB.186.15.5147–5152.2004.
288. Zhou, D. Genome-wide transcriptional response of *Yersinia pestis* to stressful conditions simulating phagolysosomal environments / D. Zhou, Y. Han, J. Qiu [et al.] // Microbes Infect. – 2006. – V. 8. – P. 2669–2678. – Text: unmediated. – doi: 10.1016/j.micinf.2006.07.015.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Номера доступа депонированных в базе данных NCBI GenBank нуклеотидных последовательностей простейших, нематод, бактерий

Вид организма, изолят	Участок гена	Номер доступа в NCBI GenBank
Простейшие рода <i>Acanthamoeba</i>		
<i>Acanthamoeba sp.</i> 10A	18S рPHK, ITS1	MG708300
<i>Acanthamoeba sp.</i> 20A	18S рPHK	MG706257
<i>Acanthamoeba sp.</i> 20A	—«—	MG706258
<i>Acanthamoeba castellanii</i> 13A	—«—	OR564022
<i>Acanthamoeba castellanii</i> 18A	—«—	OR564021
<i>Acanthamoeba sp.</i> 5A	—«—	OR564020
<i>Acanthamoeba castellanii</i> 4A	—«—	OR564019
<i>Acanthamoeba castellanii</i> 2A	—«—	OR564018
<i>Acanthamoeba castellanii</i> 1A	—«—	OR564015
Простейшие рода <i>Dictyostelium</i>		
<i>Dictyostelium sp.</i>	17S рPHK	MG721535
<i>Dictyostelium sp.</i>	17S, ITS1, 5.8S, ITS2, 26S рPHK	MG721534
<i>Dictyostelium sp.</i> 10D	—«—	MG709140
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 13D	—«—	OR568556
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 8D	—«—	OR568557
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 9D	—«—	OR568555
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 1D	—«—	OR568551
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 2D	—«—	OR568552
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 5D	—«—	OR568554
<i>Dictyostelium sphaerocephalum</i> 4D	—«—	OR568553
Нематоды		
<i>Panagrolaimus sp.</i> 13H	18S рPHK	OR564005
<i>Rubzovinema sp.</i> 269	18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S рPHK	OR660114
<i>Rubzovinema sp.</i> 268	—«—	OR580983
<i>Rubzovinema sp.</i> 250	—«—	OR580980
<i>Rubzovinema sp.</i> 254	—«—	OR580979
<i>Rubzovinema sp.</i> 253	—«—	OR580978
<i>Rubzovinema sp.</i> 245	—«—	OR580977
<i>Rubzovinema sp.</i> 138	—«—	OR580975
<i>Rubzovinema sp.</i> 88	—«—	OR580974
Бактерии		
<i>Wolbachia sp.</i> 245	16S рPHK	OR568562