

УДК 579.69

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ГРУППЫ *Bacillus cereus* COMPLEX, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ В ЯКУТИИ, ДЛЯ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КЛИМАТА

© 2023 г. Ю. О. Гончарова¹ *, В. В. Евсеева¹, Р. И. Миронова¹, К. В. Хлопова¹, А. Г. Богун¹,
А. А. Сизова¹, В. И. Соломенцев¹, Г. М. Титарева¹, И. В. Бахтеева¹, Т. Б. Кравченко¹,
А. В. Брушков^{2,3}, В. С. Тимофеев¹, С. Г. Игнатов^{1,2} **,

¹ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Московская область, Серпухов, р.п. Оболенск, 142279 Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

³ Тюменский государственный университет, Тюмень, 625003 Россия

*e-mail: iulia.belay@yandex.ru;

**e-mail: ignatov@obolensk.org

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Из проб почвы в регионе вечной мерзлоты (Якутия, Россия) выделены штаммы рода *Bacillus* и дана их фенотипическая характеристика. Анализ полученных данных позволил отнести их к группе *Bacillus cereus* complex. ПЦР-анализ позволил определить профиль генов синтеза токсинов *B. cereus* в геномах исследуемых штаммов. Получена генетическая характеристика путем RAPD-генотипирования и с использованием MLVA-локусов, применяемых для генотипирования возбудителя сибирской язвы. Результаты генотипирования разного уровня разрешения позволили дифференцировать исследуемые штаммы от вида *B. anthracis*, показать их внутривидовые генетические различия и степень родства. Осуществлено полногеномное секвенирование, на основе данных которого проведено MLST-генотипирование, которое выявило 2 известных сиквенс-типа и один новый, впервые описанный в настоящей работе. Полученные результаты имеют прикладное значение и крайне интересны с точки зрения эволюции и филогеографии группы *B. cereus* complex, поскольку факт выделения штаммов из вечной мерзлоты дает основания предположить, что их возраст может быть гораздо выше предполагаемого.

Ключевые слова: *Bacillus cereus* complex, *Bacillus anthracis*, токсины, генотипирование, MLVA, MLST, RAPD, вечная мерзлота

DOI: 10.31857/S0555109923060053, **EDN:** CVASHJ

Сценарии изменения климата прогнозируют повышение среднегодовой температуры воздуха во всем мире. Такие климатические изменения могут иметь важные последствия: возникновение микробиологических рисков, связанных с высвобождением патогенов из вечной мерзлоты. Особенно резкие климатические изменения наблюдаются в Арктическом регионе России, на который приходится более половины всей арктической территории и населения [1]. Для прогнозирования биологических рисков, связанных с потеплением, необходимо выделение и характеристика потенциальных патогенов из мерзлотных в настоящее время областей. Спорообразующие бактерии группы *Bacillus cereus* complex представляют собой интересную модель для изучения воздействия изменения климата на патогены [2].

Группа *Bacillus cereus* complex образована 9 близкородственными видами, для которых характерна высокая степень генетического сходства, что создает проблему определения вида при исследовании выявленных штаммов рода *Bacillus* [3]. Эта проблема усугубляется наличием в группе опасных патогенов, таких как *B. cereus*, который вызывает пищевые токсикоинфекции человека [4], и *B. anthracis*, который относится ко II группе патогенности и является возбудителем сибирской язвы — карантинной инфекции травоядных животных и человека [5]. При выделении нового штамма рода *Bacillus* из того или иного источника, актуально в максимально сжатые сроки определить его вид, а также получить фенотипическую характеристику и оценить патогенный потенциал.

Основными широко используемыми приемами, которыми осуществляют фенотипическую харак-

теристику штаммов бацилл являются: определение подвижности, лецитиназной, фосфатазной и гемолитической активностей, а также чувствительности к диагностическим бактериофагам. Эти подходы также позволяют определить вид исследуемого штамма и дифференцировать его от вида *B. anthracis* [6].

Для более полноценной и точной характеристики применяют методы типирования, такие как хромосомный рестрикционный анализ ДНК, плазмидное типирование, риботипирование и импульсно-полевой гель-электрофорез (PFGE – pulsed-field gel electrophoresis) [7]. Используются также методы генотипирования, основанные на ПЦР, например, случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD – randomly amplified polymorphic DNA), которая позволяет дифференцировать анализируемые штаммы на основе сравнения размера и числа продуктов амплификации с использованием нескольких ПЦР-праймеров [8, 9]. Широко используется метод полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP – amplified fragment length polymorphism) [10, 11] и мультилокусный электрофорез ферментов (MEE – multilocus enzyme electrophoresis) [12]. Мультилокусное сиквентс-типирование (MLST – Multilocus Sequence Typing), основанное на анализе нуклеотидных последовательностей нескольких локусов генов домашнего хозяйства, позволяет отнести штамм к тому или иному сиквентс-типу (ST), который характерен для одного из видов группы *B. cereus* complex [13, 14]. Для возбудителя сибирской язвы разработан подход мультилокусного анализа вариативных нуклеотидных тандемных повторов (MLVA – multiple locus VNTR analysis), который рекомендуется использовать в качестве генетического анализа первой линии [15, 16]. Эти методы позволяют не только определить видовую принадлежность штамма, но и дифференцировать штаммы одного вида между собой с разной степенью разрешения.

Безусловно, при отнесении штамма к виду *B. cereus*, важно охарактеризовать его возможные патогенные свойства. Одними из факторов патогенности *B. cereus* являются токсины. Термостабильный токсин цереулид опосредует рвотный синдром при пищевом отравлении, вызванном *B. cereus*. Синтез данного токсина осуществляет белковый комплекс, компоненты которого кодируют несколько генов [17, 18]. Диарейный синдром вызывают энтеротоксины, такие как: негемолитический энтеротоксин (Nhe), гемолизин BL (Hbl), цитотоксин K (CytK) и энтеротоксин FM (EntFM) [19]. Эти токсины выявляются с помощью иммуноферментного анализа, ПЦР [17, 20–22] и масс-спектрометрии MALDI-TOF [23]. Путем ПЦР-амплификации в геномах анализируемых штаммов можно обнаружить гены перечисленных токсинов и выдвинуть предположение об их патогенности [21].

В Якутии (Россия) из проб почвы, находящейся в вечной мерзлоте, отобранных на месте находки мумий пещерных львят, были выделены и всесторонне изучены 3 штамма возбудителя сибирской язвы, описанных нами ранее [16]. Помимо них, из тех же самых проб были выделены другие 26 штаммов рода *Bacillus*, 10 из которых отнесены к группе *B. cereus* complex и исследованы в настоящей работе.

Цель работы – получение фенотипической и генетической характеристики 10 выделенных из вечной мерзлоты штаммов группы *B. cereus* complex для оценки микробиологических рисков, поскольку виды этой группы генетически близки к виду *B. anthracis*.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. В работе исследованы 10 штаммов группы *B. cereus* complex: YakM1, YakM2, YakM3, YakM4, YakM7, YakM8, YakM9, YakM10, YakM11-2 и YakM15. Все штаммы были выделены в 2016 г. из образцов почвы, находящейся в вечной мерзлоте.

Определение культуральных и морфологических характеристик. Культуры штаммов рассевали до получения единичных колоний и выращивали на плотной питательной среде ГРМ-агар (панкреатический гидролизат рыбной муки, ГНЦ ПМБ, Россия) при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Морфологию колоний оценивали по микроскопии с использованием микроскопа “AxioStar” (“K. Zeiss”, Германия, окуляр – 10×, объектив – 40×).

Подвижность, фосфатазную и лецитиназную активности, а также чувствительность к бактериофагам определяли согласно Маринину [6].

Подвижность микробных клеток определяли методом микроскопического исследования в раздавленной капле.

Фосфатазную активность выявляли при выращивании культур на плотной питательной среде агар Хоттингера (ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 0.001% фенолфталеинфосфата натрия в течение 24 ч. при 36°C. После этого в крышку чашки Петри помещали фильтровальную бумагу и наливали 1–2 мл 23%-ного водного раствора аммиака. Под действием паров аммиака колонии, продуцирующие щелочную фосфатазу, окрашивались в розовый цвет.

Лецитиназную активность определяли путем выращивания культур на плотной яично-желточной среде, которую готовили путем добавления желтка куриного яйца в агар Хоттингера. Учет проводили через 12, 24 и 48 ч. культивирования при 36°C по ореолу преципитации.

Гемолитическую активность проверяли, выращивая культуры штаммов на агаризованной сре-

Таблица 1. Праймеры для проведения RAPD-генотипирования

Праймер	Последовательность 5' → 3'
Primer A	ATCAGCGCACCA
Primer B	GCCAGCTGTACG
Primer C	TGCCTCGCACCA
Primer D	GCCCCGTTAGCA
Primer E	CCGCAGTTAGAT
Primer F	ACTGGCCGAGGG
Primer G	TTCGGACGAATA
Primer H	AGAATTGGACGA

де, содержащей 5% дефибринированной крови. Высевы выдерживали 18–20 ч при 36°C, после чего учитывали результаты.

Определение чувствительности микробной культуры к бактериофагам осуществляли следующим образом: на агаризованную среду высевали по 0.2 мл 18-часовой бульонной культуры, в центр подсохшего газона наносили препарат бактериофага, содержащий 1×10^6 БОЕ/см³, результаты учитывали через 18–24 ч.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение ДНК исследуемых штаммов осуществляли с помощью набора “Genomic DNA Purification Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Обеззараживание материала осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-2009.

Полногеномное секвенирование. Библиотеки были подготовлены с помощью набора “Nextera DNA Library Preparation Kit” (“Illumina”, США). Полногеномное секвенирование осуществляли с использованием прибора “MiSeq” (“Illumina”,

США) и соответствующего набора реагентов “Miseq Reagent Kit v3” (“Illumina”, США).

RAPD-генотипирование и ПЦР-индикация наличия в геноме штамма группы *B. cereus* генов энтеротоксинов. RAPD-генотипирование осуществляли, как описано в работе Инатсу с соавт. [24], с использованием праймеров, представленных в работе Кувана с соавт. [25] (табл. 1).

Наличие в геномах штаммов генов синтеза токсинов (*cytK*, *hblC*, *entFM*, *nheA*, *ces*, *CER*) определяли методом ПЦР-детекции с использованием праймеров, предложенных в работе Ким с соавт. [21] (табл. 2).

Реакции амплификации проводили с использованием термоциклера “T100 thermal cycler” (“Bio-Rad”, США) и набора реагентов и “5X реакционная смесь qPCRmix-HS” (“Евроген”, Россия) согласно инструкциям производителей. В качестве источника матрицы добавляли раствор ДНК исследуемых штаммов (5–20 нг ДНК на реакцию). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1.0–1.2%-ном агарозном геле (“Sigma-Aldrich”, США) в 1 × Трис-ацетатном электродном буфере (ТАЕ). Размер фрагмента определяли по маркеру молекулярных масс “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

MLVA-генотипирование. MLVA-генотипирование осуществляли согласно протоколу, описанному в работе [26], по 17 MLVA-маркерам [15, 26–29]: *vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44*, *VNTR23*, *vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*, используемым для MLVA-генотипирования *B. anthracis*. Генотипирование штамма включало 17 ПЦР-реакций. Праймеры представлены в табл. 3.

Таблица 2. Праймеры для ПЦР-индикации наличия в геноме штамма группы *B. cereus* complex генов энтеротоксинов

Энтеротоксин <i>B. cereus</i>	Ген-мишень	Последовательность 5'→3'	Размер ПЦР-продукта, п.о.
Цитотоксин К	<i>cytK</i>	TGCTAGTAGTGCTGTAACCTC	881
		CGTTGTTTCCAACCCAGT	
Негемолитический энтеротоксин А	<i>nheA</i>	GGAGGGGGCAAACAGAAGTGAA	750
		CGAAGAGCTGCTTCTCTCGT	
Гемолизин BL	<i>hblC</i>	CGCAACGACAAATCAATGAA	421
		ATTGCTTCACGAGCTGCTTT	
Цереулид	<i>ces</i>	TTCCGCTCTCAATAAATGGG	634
		TCACAGCACATTCCAAATGC	
	<i>CER</i>	GCGTACCAAATCACCCGTTT	546
		TGCAGGTGGCACACTTGTTA	
Энтеротоксин FM	<i>entFM</i>	AGGCCAGCTACATACAACG	327
		CCACTGCAGTCAAAACCAGC	

Таблица 3. Праймеры для MLVA-генотипирования

Локус	Наименование праймера	Последовательность 5'→3'
vrrA	vrrA-F	CACAAC TACCACCGATGGCACA
	vrrA-R	GCGCGTTTCGTTTGATTCATAC
vrrB1	vrrB1-F	ATAGGTGGT TTTCCGCAAGTTATTC
	vrrB1-R	GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG
vrrB2	vrrB2-F	CACAGGCTATTCTTTATCAAAC TCA TC
	vrrB2-R	CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA
vrrC2	vrrC2-F	CCAGAAGAAGTGGAACCTGTAGCAC
	vrrC2-R	GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC
bams01	bams01-F	GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCCTTTT
	bams01-R	AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC
bams03	bams03-F	GCAGCAACAGAAAAC TCTCTCCAATAACA
	bams03-R	TCCTCCCTGAGAACTGCTATCACCTTTAAC
bams05	bams05-F	GCAGGAAGAACA AAAAGAACTAGAAAGAGCA
	bams05-R	ATTATTAGCAGGGG CCTCTCCTGCATTACC
bams21	bams21-F	TGTAGTGCCAGATTTGTCTTCTGTA
	bams21-R	CAAATTTTGAGATGGGAGTTT TACT
bams22	bams22-F	ATCAAAAAT TCTTGGCAGACTGA
	bams22-R	ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA
bams23	bams23-F	CGGTCTGTCTCTATTATTCAGTGGT
	bams23-R	CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC
bams24	bams24-F	CTTCTACTTCCGTACTTGAAATTGG
	bams24-R	CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA
bams25	bams25-F	CCGAATACGTAAGAAATAAATCCAC
	bams25-R	TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT
bams28	bams28-F	CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT
	bams28-R	TATTAAACCAGGCGTTACTTACAGC
bams34	bams34-F	CAGCAAAATCAATCGAATCAAA
	bams34-R	TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG
bams44	bams44-F	GCGAATTAATTGCTCCTCAAAT
	bams44-R	GCACTTGAATATTTGGCGGTAT
bams51	bams51-F	ATTTCTCTGAGCAGGTTGTGTT
	bams51-R	TGCATCTAACAATGCAGAACAA
VNTR23	VNTR23-F	TTTAGAAACGTTATCACGCTTA
	VNTR23-R	GTAATACGTATGGTTCATTCCC

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2–3%-ном агарозном геле и 0.5× Трис-боратном электродном буфере (ТБЕ). Размер фрагмента определяли по маркерам молекулярных масс “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США) и “EZ Load 20 bp

Molecular Ruler” (“Bio-Rad”, США) с использованием программы “PhotoCampMw 99.04” (“VilberLourmat”, Франция). В качестве референсного штамма для сравнения длин фрагментов использовали *B. anthracis* Pasteur II (“ГКПМ-Оболensk”, Россия). Полученные размеры ампликонов пере-

Таблица 4. Фенотипическая характеристика штаммов

Штамм	Подвижность	Лейцитиназная активность	Фосфатазная активность	Гемолитическая активность	Гамма А-26	В-Fah
YakM1	+	+	+	+	—	—
YakM2	+	+	+	+	—	—
YakM3	+	+	+	+	—	—
YakM4	+	+	+	—	—	—
YakM7	+	+	+	+	+	—
YakM8	+	+	+	+	—	—
YakM9	+	+	+	+	—	—
YakM10	+	+	+	+	+	—
YakM11-2	+	+	+	+	—	—
YakM15	+	+	+	+	+	—

Примечание: + — признак выражен; — признак не выражен.

водили в количество tandemных повторов для данного локуса, как описано в работе [29]. В результате получали MLVA-профили штаммов.

MLST-генотипирование. Для MLST-генотипирования использовали схему, описанную в работе Прист с соавт. в 2004 г. [14]. Для исследуемой выборки получены сборки и определены нуклеотидные последовательности следующих локусов: *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi*. Полученным последовательностям присваивали номера аллелей, а на основе комбинации номеров аллелей определяли ST штаммов в соответствии с сервисом базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/bcereus/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культуральная и морфологическая характеристика штаммов. На первом этапе у исследуемых штаммов был определен ряд диагностически важных фенотипических признаков: морфология колоний, подвижность, лецитиназная, фосфатазная и гемолитическая активности, чувствительность к диагностическим сибиреязвенным бактериофагам Гамма А-26 и В-Fah (ВНИИВВиМ). Результаты представлены в табл. 4. Каждый штамм имел мономорфные колонии, однако между собой штаммы морфологически различались. Полученные результаты в совокупности позволили отнести все исследуемые штаммы к группе *B. cereus* complex и дифференцировать их от вида *B. anthracis*. Однако, интересно отметить, что штамм YakM4 не обладал гемолитической активностью, характерной для данного вида, а штаммы YakM7, YakM10 и YakM15 оказались чувствительны к сибиреязвенному бактериофагу Гамма А-26. Это позволило сделать предположение о тесной связи перечисленных штаммов с *B. anthracis*, поскольку ранее уже были описаны подобные случаи негемолитичных и чувствительных к гамма-фагу штаммов *B. cereus*, близкородственных возбудителю сибирской язвы [30, 31].

Определение профиля энтеротоксинов. Штаммы *B. cereus* способны вызывать серьезные пищевые токсикоинфекции, поэтому одним из важных аспектов при исследовании вновь выделенного штамма является определение профиля энтеротоксинов, как основных факторов патогенности данного вида микроорганизмов. Одним из способов решения этой задачи является ПЦР-индикация генов, кодирующих соответствующие токсины в геноме штамма [17, 21]. Нами были использованы праймеры, предложенные в работе [21] для ПЦР-индикации 6 генов синтеза токсинов — цитотоксина К (*cytK*), негемолитического энтеротоксина А (*nheA*), гемолизина BL (*hblC*), энтеротоксина FM (*entFM*) и рвотного токсина цереулида (*ces* и *CER*). Перечисленные токсины синтезируются штаммами *B. cereus*, вызывающими пищевые токсикоинфекции с диарейной или рвотной симптоматикой [20]. Полученные результаты приведены в табл. 5.

Как видно из табл. 5, только штаммы YakM1, YakM2 и YakM4 несут в геноме ген *hblC* и лишены гена *entFM*, ген *nheA* выявлен у всех штаммов исследуемой выборки и ни у одного из штаммов не выявлено положительной реакции на гены *cytK*, *CER* и *ces*. Однако, согласно результатам полногеномного секвенирования, ген *cytK* обнаружен у YakM9 и YakM11-2, ген *hblC* выявлен в геномах YakM1, YakM2, YakM3, YakM7, YakM10 и YakM15, *entFM* обнаружен у YakM1 и YakM15, *nheA* выявлен у всех штаммов, за исключением YakM4. Расхождение результатов ПЦР и секвенирования может быть обусловлено отсутствием референсного штамма и, соответственно, генома, для вида *B. cereus* и группы *B. cereus* complex, а также выраженным полиморфизмом перечисленных генов.

Эти результаты интересны с учетом факта выделения штаммов из вечной мерзлоты. Поскольку функция токсинов, как факторов патогенности, заключается в поражении желудочно-кишечного тракта хозяина, интересно предположить, в отношении каких видов-хозяев данные токсины могли

Таблица 5. Профиль генов синтеза токсинов штаммов группы *B. cereus* complex

Штамм	Детектируемый ген					
	<i>cytK</i>	<i>hblC</i>	<i>entFM</i>	<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>CER</i>
YakM1	—	+	—	+	—	—
YakM2	—	+	—	+	—	—
YakM3	—	—	+	+	—	—
YakM4	—	+	—	+	—	—
YakM7	—	—	+	+	—	—
YakM8	—	—	+	+	—	—
YakM9	—	—	+	+	—	—
YakM10	—	—	+	+	—	—
YakM11-2	—	—	+	+	—	—
YakM15	—	—	+	+	—	—

использоваться при условии экспрессии генов, наличие которых выявлено в геномах.

Помимо фенотипических характеристик, которые, в свою очередь, определили спектр следующих подходов, примененных для изучения данных штаммов, возникла необходимость также охарактеризовать штаммы с генетической точки зрения.

RAPD-генотипирование. RAPD-генотипирование является одним из наиболее простых методов генотипирования штаммов рода *Bacillus* [8, 9, 24, 32], позволяет получить генетическую характеристику штамма за несколько часов и не требует использования данных секвенирования, что крайне важно с финансовой точки зрения, поэтому оно было проведено в первую очередь. Этот подход позволил определить, являются ли штаммы, име-

ющие одинаковую фенотипическую характеристику, идентичными на уровне генома.

RAPD-генотипирование показало, что все исследуемые изоляты имеют различия. Однако наиболее схожий RAPD-профиль выявлен у штаммов: YakM8, YakM9 и YakM11-2, а также YakM10 и YakM15. Примеры результатов RAPD-генотипирования представлены на рис. 1 и 2.

Эти результаты позволили сделать предварительный вывод о том, что штаммы, взятые из одной географической точки, имеют генетические различия, что вызвало интерес к проведению более глубоких генетических исследований.

Применение MLVA-локусов *B. anthracis* в отношении других видов группы *B. cereus* complex. Поскольку *B. anthracis* и другие виды группы *B. cereus* complex являются крайне близкородственными на генетическом уровне, было выдвинуто предположение о возможности применения хромосомных VNTR-локусов *B. anthracis* для MLVA-генотипирования и дифференцирования других штаммов данной группы. В ряде работ была показана возможность не только применения этого высокоразрешающего метода для генетической характеристики штаммов *B. anthracis*, но и возможность его использования для дифференцирования *B. anthracis* от других видов рода *Bacillus*, поскольку по ряду VNTR-локусов возможна амплификация продуктов, размер которых значительно отличается от типичных для *B. anthracis* [15, 31, 33]. Мы предположили, что в случае успешного использования данного подхода, возможно выявление наиболее близких с филогенетической точки зрения штаммов к виду *B. anthracis*, как, например *B. cereus* bv. *anthracis*, который известен способностью вызывать

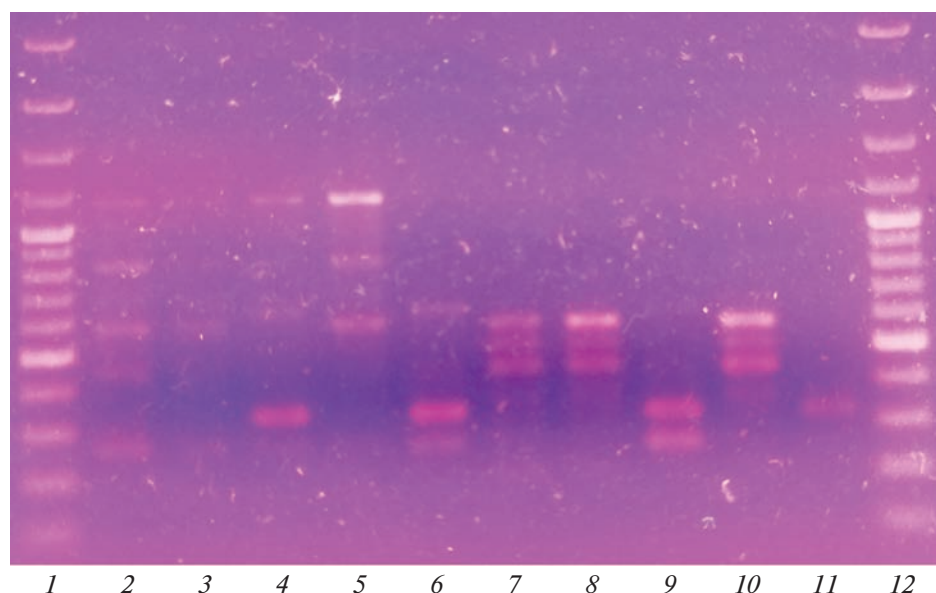


Рис. 1. RAPD-генотипирование с использованием праймера Primer A: 1, 12 – маркер молекулярных масс “GeneRuler 100 bp DNA Ladder”; продукты амплификации штаммов: 2 – YakM1, 3 – YakM2, 4 – YakM3, 5 – YakM4, 6 – YakM7, 7 – YakM8, 8 – YakM9, 9 – YakM10, 10 – YakM11-2, 11 – YakM15.

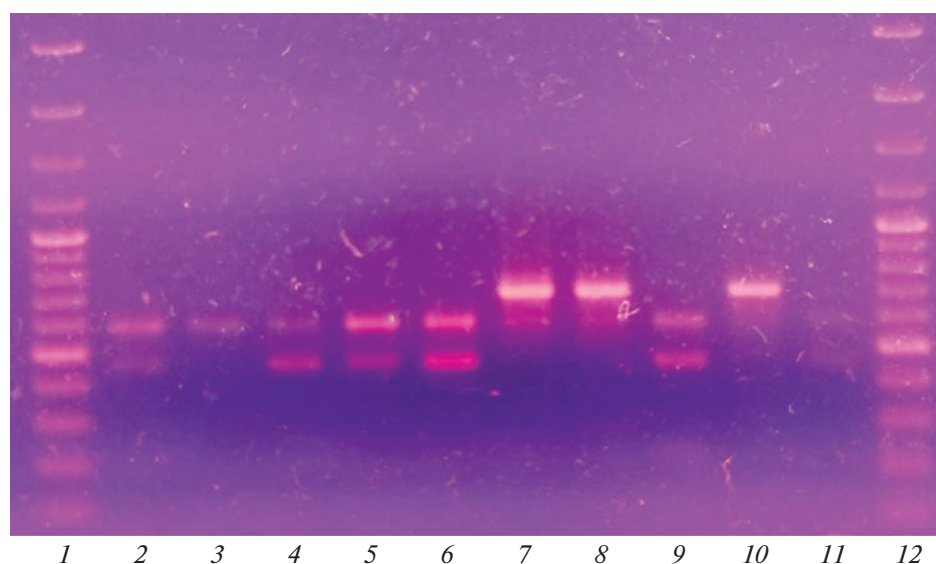


Рис. 2. RAPD-генотипирование с использованием праймера Primer B: 1, 12 – маркер молекулярных масс “GeneRuler 100 bp DNA Ladder”; продукты амплификации штаммов: 2 – YakM1, 3 – YakM2, 4 – YakM3, 5 – YakM4, 6 – YakM7, 7 – YakM8, 8 – YakM9, 9 – YakM10, 10 – YakM11-2, 11 – YakM15.

схожее с сибирской язвой заболевание у приматов [34]. Поэтому, мы применили предложенные рядом авторов праймеры для MLVA-генотипирования *B. anthracis* [15, 26–29] при генотипировании исследуемых в данной работе штаммов. Результаты приведены в табл. 6.

Таким образом, осуществлен MLVA-анализ исследуемой выборки с использованием 17 VN-TR-локусов. Обнаружено, что несмотря на то, что используемые праймеры сконструированы для *B. anthracis*, по ряду локусов у исследуемых изолятов проходила амплификация. Однако часть локусов (bams01, bams22, bams23, bams34, vrrC2) оказалась неприменима из-за отсутствия продукта амплификации или его неспецифичного накопления, при котором размер составил более

900 п.н., в связи с чем невозможно определить его точный размер по результатам электрофореза в агарозном геле. Тем не менее, одинаковый MLVA-профиль выявлен у штаммов YakM1, YakM2 и YakM4, YakM8, YakM9 и YakM11-2, а также YakM7 и YakM10. Близкий, хоть и не одинаковый, MLVA-профиль характерен для штаммов YakM3, YakM15 и YakM7, YakM10. Данные результаты частично согласуются с результатами RAPD-генотипирования, однако MLVA может иметь более низкое разрешение и основано на полиморфизме других локусов. Это говорит в пользу необходимости комплексного подхода генотипирования при исследовании таких мономорфных групп как *B. cereus* complex. Однако, поскольку данный метод является одним из наиболее высокоразрешаю-

Таблица 6. MLVA-профили штаммов

Штамм	VNTR-локус											
	vrrA	bams03	bams05	bams44	VNTR23	bams21	bams24	bams25	bams28	bams51	vrrB1	vrrB2
YakM1	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM2	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM3	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	7	26	15
YakM4	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM7	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	НЛ	26	НЛ
YakM8	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM9	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM10	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	НЛ	26	НЛ
YakM11-2	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM15	8	—*	6	4	2	9	7	11	14	НЛ	26	3

Примечание: цифрами обозначено число нуклеотидных повторов в VNTR-локусах; * – размер фрагмента слишком большой для определения по результатам электрофореза в агарозном геле; НЛ – нет локуса (локус не амплифицируется).

Таблица 7. MLST-генотипирование штаммов группы *B. cereus* complex

Штамм	Аллельный профиль							MLST-ST
	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>	
YakM1	8	10	79	36	56	22	11	—*
YakM2	8	10	79	36	56	22	11	—
YakM3	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM4	8	10	79	36	56	22	11	—
YakM7	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM8	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM9	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM10	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM11-2	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM15	86	57	81	80	80	90	32	217

Примечание: цифрами обозначены номера аллелей по каждому из локусов и номера сиквенс-типов, согласно сервису PubMLST; *выявлен впервые описанный сиквенс-тип.

щих способов генотипирования *B. anthracis*, вероятно, одинаковый MLVA-профиль исследуемых нами штаммов говорит о их крайне близком родстве, либо о том, что они, по сути, являются одним штаммом. Ранее была показана возможность использования сибирезвенных MLVA-локусов для дифференцирования *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis*, а также поиска наиболее тесно связанных с *B. anthracis* других штаммов рода *Bacillus* [31, 33]. В настоящей работе показана возможность дифференцирования путем MLVA штаммов *B. anthracis* и группы *B. cereus* complex и выявлены различия по ряду локусов между исследуемыми штаммами.

MLST-генотипирование. MLST является одним из самых надежных способов генотипирования для группы *B. cereus* complex и особенно успешно позволяет определить вид исследуемого изолята. Мы использовали одну из наиболее популярных схем MLST в отношении исследуемых штаммов [14]. По результатам полногеномного секвенирования были определены номера аллелей и ST в соответствии с базой данных (<https://pubmlst.org/bcereus/>). Результаты представлены в табл. 7.

Среди исследуемой выборки к ST-217 принадлежали 4 штамма, а к ST-32 — 3 штамма. В базе данных PubMLST, в которой на момент написания работы содержалась информация о 5521 штаммах группы *B. cereus* complex, к ST-217 относится один штамм — KW14 (место и дата выделения неизвестны), а к ST-32 отнесены 27 штаммов (выделены из пищевых продуктов в США, Канаде, Южной Корее, Китае и Тайване). Как видно из табл. 7, у штаммов YakM1, YakM2 и YakM4 выявлена комбинация аллелей, которая не соответствует ни одному из ранее описанных сиквенс-типов. Однако, согласно PubMLST, данный ST входит в состав 196 клонального комплекса, куда входят 58 других ST. Таким образом, в данной работе мы выявили новый ранее не описанный MLST-ST у

штаммов группы *B. cereus* complex, найденных в почве вечной мерзлоты.

Выявление как редких, так и ранее не описанного ST представляет интерес с точки зрения эволюции группы *B. cereus* complex. В географической точке на месте находки мумий пещерных львят, был выделен ряд штаммов *B. anthracis*, причем 3 из них принадлежали разным эволюционным линиям — А и В [16, 35]. Позднее из тех же образцов почвы были выделены и штаммы, исследуемые в настоящей работе. Интересно, что эти 10 штаммов относятся к трем известным и одному новому ST, а штаммы *B. anthracis* отнесены к ST-1 и ST-3. То есть большинство штаммов рода *Bacillus* относятся к разным эволюционным ветвям и в данной географической точке наблюдается значительный полиморфизм как среди *B. anthracis*, так и среди группы *B. cereus* complex в целом. Кроме того, важно отметить, что локусы, используемые для MLST-генотипирования, представляют собой гены домашнего хозяйства, которые обладают сравнительно медленной эволюцией, что является еще одним аргументом в пользу высокого биоразнообразия штаммов, принадлежащих к близкородственным видам и выделенных буквально в одной точке [14]. Необходимо обратить внимание на то, что все штаммы выделены в Якутии из образцов почвы, находящейся в аллювиальных отложениях Голоцена [16]. Несмотря на то, что ранее время консервации штаммов *B. anthracis* в мерзлоте определено, как относящееся к XIII–XVI векам, факт выделения их из вечной мерзлоты дает основания предположить, что их возраст может быть гораздо больше предполагаемого, вплоть до нескольких тысячелетий, в то время как вид *B. anthracis* появился приблизительно 12–26 тыс. лет назад [36]. Это свидетельствует о важности данного региона Якутии в происхождении и эволюции самого вида *B. anthracis*. Поэтому данная гипотеза требует дальнейшей разработки, а новые штаммы — более глубокого изучения.

Таким образом, в настоящей работе проведено исследование 10 штаммов *B. cereus* complex, выделенных из образцов почвы, находящейся в вечной мерзлоте на территории Якутии. Проведено фенотипическое исследование штаммов культуральными и биохимическими методами. Методом ПЦР определен профиль наличия в их геноме генов, кодирующих энтеротоксины. Затем проведено MLVA-генотипирование с использованием локусов, применяемых для генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы, что позволило дифференцировать штаммы *B. cereus* complex от *B. anthracis* и выявить их различия и сходства по ряду локусов. На основе результатов проведенного секвенирования геномов осуществлено MLST-генотипирование, в результате которого выявлено 2 ранее описанных, но достаточно редких ST и один не описанный и не зарегистрированный в базе данных PubMLST ST, что очень важно в целом для фундаментальных и филогенетических исследований группы *B. cereus* complex.

Полученные результаты подчеркивают важность использования методов генотипирования при исследовании такой мономорфной группы как *B. cereus* complex, причем необходимо использовать именно комплекс подходов, преимущественно основанных на данных полногеномного секвенирования. Исследование данной группы микроорганизмов показало свою актуальность и с точки зрения оценки микробиологических рисков в Арктическом регионе при изменении климата, в связи с выявлением вирулентных штаммов возбудителя сибирской язвы, а также крупной вспышкой этого заболевания среди оленей летом 2016 г., которая была спровоцирована таянием вечной мерзлоты с законсервированными в ней спорами, а также выделением других родов микроорганизмов, имеющих патогенный потенциал [16, 39, 40].

Материал подготовлен в рамках секторальной программы Роспотребнадзора. Работа частично выполнена в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ГНЦ ПМБ и АНО "Губернская академия".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stepanov I., Makarov I., Makarova E. et al. // Climatic Change. 2023. V. 176. № 4. P. 39. <https://doi.org/10.1007/s10584-023-03512-5>
2. Baldwin V.M. // Front. Microbiol. 2020. P. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>
3. Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 17. e01096-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01096-17>
4. Jovanovic J., Ornelis V.F.M., Madder A., Rajkovic A. // Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf. 2021. V. 20. № 4. P. 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
5. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. / М.: ЗАО МП Гигиена, 2008. 416 с.
6. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие. / Ред. И.А. Дятлов. М.: Издательство "Династия", 2021. 240 с.
7. Drean P., Fox E.M. // Methods Mol. Biol. 2015. № 1301. P. 71–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2599-5_7
8. Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 3. P. 1298–303. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1298-1303.1999>
9. Oh M.H., Ham J.S., Cox J.M. // Int. J. Food Microbiol. 2012. V. 152. № 1–2. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018>
10. Ripabelli G., McLauchlin J., Mithani V., Threlfall E.J. // Lett. Appl. Microbiol. 2000. V. 30. № 5. P. 358–63. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00729.x>
11. Hill K.K., Ticknor L.O., Okinaka R.T., Asay M., Blair H., Bliss K.A. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 2. P. 1068–1080. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1068-1080.2004>
12. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2627–2630. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000>
13. Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolstø A.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 1. P. 191–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004>
14. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W., Holmes E.C., Maiden M.C. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 23. P. 7959–7970. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004>
15. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2928–2936. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000>
16. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D. et al. // PLoS One. 2019. V. 14. № 5. e0209140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209140>
17. Ehling-Schulz M., Guinebretiere M.H., Monthan A., Berge O. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 260. № 2. P. 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x>
18. Marxen S., Stark T.D., Frenzel E., Rüttschle A., Lücking G., Pürstinger G. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 9. P. 2439–2453. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8511-y>
19. Dietrich R., Jessberger N., Ehling-Schulz M., Märtlbauer E., Granum P.E. // Toxins (Basel). 2021. V. 13. № 2. P. 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
20. Kim J.B., Kim J.M., Kim S.Y., Kim J.H., Park Y.B., Choi N.J. et al. // J Food Prot. 2010. V. 73. № 7. P. 1219–1224. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.7.1219>
21. Kim J.M., Forghani F., Kim J.B., Park Y.B., Park M.S., Wang J. et al. // Food Science and Biotechnology. 2012. V. 21. № 5. P. 1439–1444. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0189-8>
22. Tallent S.M., Hait J.M., Bennett R.W. // J. Appl. Microbiol. 2015. V. 118. № 4. P. 1068–1075. <https://doi.org/10.1111/jam.12766>
23. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovic A., Uyttendaele M. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 404. № 6–7. P. 1691–1702. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6254-6>

24. Inatsu Y., Chotiko A., Ananchaipattana C. // Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 2020. V. 54. № 1. P. 47–51.
<https://doi.org/10.6090/jarq.54.47>
25. Kuwana R., Imamura D., Takamatsu H., Watabe K. // Biocontrol Sci. 2012. V. 17. № 2. P. 83–86.
<https://doi.org/10.4265/bio.17.83>
26. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramière V. et al. // BMC Microbiol. 2001. V. 1. P. 2.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-2>
27. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., le Doujet C. et al. // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 33.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-33>
28. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J. et al. // PLoS One. 2007. V. 2. № 5. e461.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
29. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C. et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. e95131.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095131>
30. Turnbull P.C. // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 87. № 2. P. 237–240.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00876.x>
31. Marston C.K., Gee J.E., Popovic T., Hoffmaster A.R. // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-22>
32. Calvigioni M., Cara A., Celandroni F., Mazzantini D., Panattoni A., Tirloni E. et al. // J. Appl. Microbiol. 2022. V. 133. № 2. P. 1078–1088.
<https://doi.org/10.1111/jam.15636>
33. Valjevac S., Hilaire V., Lisanti O., Ramière F., Hernandez E., Cavallo J.D. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 6613–6623.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6613-6623.2005>
34. Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F. et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. V. 10. № 9. e0004923.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004923>
35. Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., Kravchenko T., Lev A., Dyatlov I., Timofeev V. // Pathogens. 2021. V. 10. № 12. P. 1556.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10121556>
36. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. № 63. P. 451–476.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073255>
37. Federhen S., Rossello-Mora R., Klenk H.P., Tindall B.J., Konstantinidis K.T., Whitman W.B. et al. // Stand. Genomic Sci. 2016. V. 11. № 1.
<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0134-1>
38. Ciufó S., Kannan S., Sharma S., Badretin A., Clark K., Turner S. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. № 7. P. 2386–2392.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
39. Stella E., Mari L., Gabrieli J., Barbante C., Bertuzzo E. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 16460.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72440-6>
40. da Silva T.H., Queres Gomes E.C., Gonçalves V.N., da Costa M.C., Valério A.D., de Assis Santos D. et al. // Fungal Biol. 2022. V. 126. № 8. P. 488–497.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.04.003>

Characteristics of *Bacillus cereus* complex Group Strains Isolated from Permafrost in Yakutia for Assessment of Microbiological Risks During Climate Change

Y. O. Goncharova^{a, *}, V. V. Evseeva^a, R. I. Mironova^a, K. V. Khlopova^a, A. G. Bogun^a, A. A. Sizova^a, V. I. Solomentsev^a, G. M. Titareva^a, I. V. Bahtejeva^a, T. B. Kravchenko^a, A. V. Brushkov^{b, c}, V. S. Timofeev^a, and S. G. Ignatov^{a, b, **}

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia

^b Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119991 Russia

^c Tyumen State University, Tyumen, 625003 Russia

*e-mail: iulia.belay@yandex.ru

**e-mail: ignatov@obolensk.org

Strains of *Bacillus* genus were isolated from soil samples in the permafrost region (Yakutia, Russia). The phenotypic characteristics of the strains are given. The analysis of the obtained data made it possible to assign them to the group *Bacillus cereus* complex. PCR analysis made it possible to determine the profile of *B. cereus* toxin synthesis genes in the genomes of the studied strains. Genetic characterization was obtained by RAPD genotyping and using MLVA loci used for genotyping of the anthrax pathogen. The results of genotyping at different levels of resolution made it possible to differentiate the studied strains from the *B. anthracis* species, to show their intraspecific genetic differences and the degree of relationship. Whole genome sequencing was carried out, based on the data of which MLST genotyping was carried out, which revealed 2 known sequence types and one new one, described for the first time in this work. The results obtained are of practical importance and are extremely interesting from the point of view of the evolution and phylogeography of the *B. cereus* complex group, since the fact that strains were isolated from permafrost suggests that their age may be much older than expected.

Keywords: *Bacillus cereus* complex, *Bacillus anthracis*, toxins, genotyping, MLVA, MLST, RAPD, permafrost