

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-106-112

УДК 616.98:579.841.11

И.Б. Захарова, П.Р. Чирсков, Д.В. Устинов, А.Д. Викторов, И.М. Шпак, А.В. Топорков,
Д.В. Викторов**ВАРИАЦИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*
НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС**

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Цель работы – анализ дифференциальной экспрессии генов у штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различным уровнем выживаемости в условиях холодого стресса. **Материалы и методы.** В качестве модельных использованы три штамма *B. pseudomallei* сиквенс-типов ST 46, ST 70 и ST 85; РНК выделяли методом мембранных колонок, стабилизировали дегидратированием; кДНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq; функции генов классифицировали в базе данных KEGG PATHWAY. **Результаты и обсуждение.** На основании анализа транскриптомов штаммов *B. pseudomallei* после длительного холодого стресса впервые описаны молекулярные механизмы адаптации *B. pseudomallei* к низким температурам. Показано, что адаптация *B. pseudomallei* к холодому стрессу связана с регуляторными процессами, приводящими к значительному снижению общей транскрипционной активности. Обнаружено две стратегии адаптации к низким температурам: 1) модуляция регуляторных процессов, приводящая к подавлению экспрессии генов основных путей метаболизма до минимального уровня, обеспечивающего жизнеспособность клетки, и активация минимально необходимого набора генов стрессового ответа; 2) менее выраженное подавление общего метаболизма в сочетании с активацией экспрессии расширенного спектра генов холодого и теплового шока, общего, осмотического и универсального стрессов. Оба механизма обеспечивают возбудителю мелиоидоза выживание в условиях длительного холодого стресса при низких положительных температурах. При отрицательных – первая стратегия показала большую эффективность, переход *B. pseudomallei* в жизнеспособное, но некультивируемое состояние происходит в долгосрочной перспективе (не менее 2 лет), при реализации второй – в течение 2 месяцев. Оценка потенциала и молекулярных механизмов адаптации этой бактерии к холодому стрессу необходима для понимания степени риска при возможном заносе *B. pseudomallei* в регионы с умеренным климатом и разработки эффективных мер обеспечения биобезопасности окружающей среды.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, ответ на холодого стресс, транскриптом.

Корреспондирующий автор: Захарова Ирина Борисовна, e-mail: zib279@gmail.com.

Для цитирования: Захарова И.Б., Чирсков П.Р., Устинов Д.В., Викторов А.Д., Шпак И.М., Топорков А.В., Викторов Д.В. Вариации адаптивного ответа *Burkholderia pseudomallei* на холодого стресс. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 1:106–112. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-106-112
Поступила 27.10.2021. Принята к публ. 11.01.2022.

I.B. Zakharova, P.R. Chirskov, D.V. Ustinov, A.D. Viktorov, I.M. Shpak, A.V. Toporkov,
D.V. Viktorov**Variations in the Adaptive Response of *Burkholderia pseudomallei* to Cold Stress**

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to analyze differential gene expression in *Burkholderia pseudomallei* strains with different survival rates under cold stress conditions. **Materials and methods.** Three strains of *B. pseudomallei* (sequence types ST 46, ST 70, and ST 85) were used as model strains. The RNA was isolated using the membrane columns method and stabilized through dehydration. The cDNA was sequenced on the Illumina MiSeq platform. Gene functions were classified using the KEGG PATHWAY database. **Results and discussion.** Based on the analysis of transcriptomes of *B. pseudomallei* strains after prolonged exposure to cold stress, the molecular mechanisms of *B. pseudomallei* adaptation to low temperatures have been described for the first time ever. It was shown that adaptation of *B. pseudomallei* to cold stress is associated with regulatory processes leading to a significant decrease in the total transcriptional activity. Two strategies of adaptation to low temperatures have been found: 1) modulation of regulatory processes leading to suppression of gene expression of the main metabolic pathways to the minimum level that ensures cell viability and activation of the minimum required set of stress response genes, and 2) less noticeable suppression of general metabolism in combination with activation of expression of an extended range of genes for cold and heat shock, general, osmotic, and universal stresses. Both mechanisms provide the causative agent of melioidosis with survival under conditions of prolonged cold stress at low positive temperatures. The first strategy showed greater efficiency at negative temperatures. The transition of *B. pseudomallei* to a viable but uncultivated state occurs in the long term (at least 2 years). While with the second strategy, this happens within 2 months. Assessment of the potential and molecular mechanisms of adaptation of this bacterium to cold stress is necessary to understand the degree of risk in case of a possible introduction of *B. pseudomallei* into regions with a temperate climate and to develop effective measures to ensure the biosafety of the environment.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, cold stress response, transcriptome.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Irina B. Zakharova, e-mail: zib279@gmail.com.

Citation: Zakharova I.B., Chirskov P.R., Ustinov D.V., Viktorov A.D., Shpak I.M., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Variations in the Adaptive Response of *Burkholderia pseudomallei* to Cold Stress. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 1:106–112. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-106-112

Received 27.10.2021. Revised Accepted 11.01.2022.

Zakharova I.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>
Chirskov P.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2847-5177>
Ustinov D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>
Viktorov A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5193-6402>

Shpak I.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6446-0274>
Toporkov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>
Viktorov D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>

Возбудитель мелиоидоза – *Burkholderia pseudomallei* – по своей природе является сапрофитом и отличается способностью быстрой адаптации к стрессовым условиям окружающей среды, что позволяет бактерии занимать разнообразные экологические ниши: от почвы, простейших, грибов и растений до представителей практически всех классов позвоночных, включая человека. В начале прошлого века считалось, что возбудитель встречается только в отдельных регионах Юго-Восточной Азии и на Цейлоне, а мелиоидоз прочно ассоциировался исключительно с жарким и влажным климатом. Но к настоящему времени установлено, что ареал *B. pseudomallei* значительно шире и охватывает регионы с тропическим и субтропическим климатом между 30-ми параллелями всех континентов [1]. Более того, в Австралии обнаружено эндемичное присутствие *B. pseudomallei* в зонах с пустынным и умеренным климатом [2, 3], а также зарегистрировано не менее чем десятилетнее присутствие возбудителя во внешней среде на территории Франции [4].

Ранее нами была показана способность *B. pseudomallei* выживать в условиях длительного воздействия низких, в том числе отрицательных, температур, что объясняет известные факты локального распространения и сохранения *B. pseudomallei* в зонах умеренного климата [5].

Бактериальный ответ на холодовой стресс включает глобальные изменения белкового профиля клетки. Первой реакцией на низкие температуры обычно является индукция РНК-связывающих белков и ферментов, таких как малые белки холодового шока (Csp), РНК-геликазы и рибонуклеазы, которые влияют на транскрипцию и, возможно, трансляцию при низкой температуре за счет своей функции шаперонирования РНК, предотвращая стабилизацию вторичных структур РНК и ДНК [6]. У *Escherichia coli* сразу после понижения температуры рост клеток временно полностью прекращается и экспрессируются белки холодового шока, способствующие адаптации, затем возобновляется синтез белков, не связанных с холодовым шоком, что позволяет клеткам расти при низкой температуре [6]. У некоторых психротолерантных бактерий с оптимумом роста в диапазоне 20–40 °С, таких как *Acinetobacter johnsonii*, при холодовом стрессе временное прекращение роста отсутствует и при низких температурах наблюдается замедление скорости роста [7]. Данных о молекулярных механизмах толерантности к низким температурам у патогенных представителей рода *Burkholderia* в доступной литературе не обнаружено. В связи с этим **цель** настоящего исследования состояла в ана-

лизе дифференциальной экспрессии генов у штаммов *B. pseudomallei* с различным уровнем выживаемости в условиях холодового стресса.

Материалы и методы

В качестве модельных использованы три штамма *B. pseudomallei* различных сиквенс-типов (ST): ST 46, ST 70 и ST 85, – имеющих широкую, среднюю и ограниченную распространенность в мировой популяции возбудителя мелиоидоза. РНК выделяли с использованием набора GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) из бактериальных взвесей в 0,45 % растворе NaCl (CareFusion, Мексика) плотностью $3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл, выдержанных 74 дня при температуре 1–5 °С; остаточную ДНК удаляли обработкой DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Литва); РНК стабилизировали дегидратированием с использованием набора RNastable (Biomatrix, США); кДНК и библиотеку для секвенирования транскриптомов получали по методике Moser [8]. Фрагментный анализ библиотеки проводили с помощью системы Experion Automated Electrophoresis System / Experion DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad, США). Фракции амплифицированных фрагментов в диапазоне от 700 до 1000 п.о. получали с использованием набора SPRiselect Reagent (Beckman Coulter, США). Адаптеры лигировали с использованием набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England BioLabs, США). Секвенирование осуществляли на платформе Illumina MiSeq с набором MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, США) в режиме парноконцевого чтения. Данные анализировали с помощью программ MagicBlast, Cutadapt 2.9, Samtools 1.9, Bcftools 1.9, bwa 0.7.17-r1188 и ассемблера SPAdes v3.11.1 [9–12], объединенных в конвейеры, реализованные на языке программирования Python 3, в качестве референтных использовали последовательности хромосом 1 и 2 *B. pseudomallei* K96243 (GenBank NC006350 и NC006351). Функции генов классифицировали по базе данных KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Статистический анализ проводили с использованием инструментов «парный двухвыборочный t-тест» и «регрессия» Microsoft Excel 2013.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе проведен сравнительный анализ транскриптомов штаммов *B. pseudomallei* после длительного холодового стресса как продолжение проведенного ранее исследования выжива-

ния возбудителя мелиоидоза при низких температурах [5]. Вкратце: после постепенной адаптации к холоду штаммы, относящиеся к ST 46, ST 70 и ST 85, выжили как после 46-суточной инкубации при близких к нулевым положительным температурам, при статистически недостоверных ($p > 0,05$) изменениях численности, так и после пяти циклов замораживания до минус 18 °С с последующим оттаиванием при статистически достоверном ($p < 0,0001$) снижении численности. Выявлены выраженные межштаммовые отличия в уровне выживания при отрицательной температуре: наиболее низкий показал штамм ST 46, изначально формировавший на агаре Эшдауна два морфотипа, штамм ST 70 с выраженной морфологической диссоциацией – наиболее высокий, штамм ST 85, изначально росший в виде микроколоний (после ряда пересевов образовал однотипные колонии обычного размера в S-форме), – средний.

Анализ транскриптомов показал, что адаптация к длительному холодовому стрессу у всех исследованных штаммов *B. pseudomallei* связана с общим подавлением экспрессии генов, участвующих практически во всех аспектах клеточного гомеостаза. У штамма ST 46 экспрессировалось 1680 генов (~28 % генома), у штамма ST 85 – 720 генов (~12 %), наиболее устойчивый к холоду штамм ST 70 транскрибировал 475 генов – всего 8 % генома. Общий для всех штаммов пул транскриптов состоял из 424 генов (рис. 1). При этом между штаммами обнаружена разница в соотношении экспрессируемых генов, локализованных на 1-й и 2-й хромосомах: 1 к 0,55 – у ST 46; 1 к 0,5 – у ST 85 и 1 к 0,6 – у ST 70. Транскрибируемые гены штаммов ST 46, ST 85 и ST 70 распределились по четырем путям основных клеточных процессов: 09100 «Метаболизм» – 47,5, 38 и 30 % соответственно; 09184 «Белки сигнальных и клеточных процессов» – 28, 36 и 38 %; 09131 «Мембранный транспорт» – 23, 24 и 29 % и 09111 «Биодеградация ксенобиотиков и метаболизм» – 1,8, 1,4 и 1,9 % соответственно. То есть наблюдалась прямая зависимость выживаемости штаммов от величины доли генов семейств «Белки сигнальных и клеточных процессов» и «Мембранный транспорт» в пуле транскриптов и обратная – от общего количе-

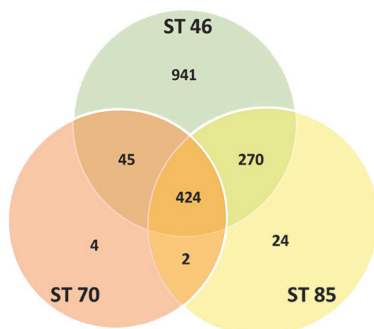


Рис. 1. Количество генов, транскрибируемых у исследованных штаммов в условиях холодового стресса

Fig. 1. The number of genes transcribed under cold stress conditions in the studied strains

ства экспрессируемых генов и величины доли генов семейства «Метаболизм» (рис. 2).

Поскольку все три штамма выжили после замораживания, но показали разный уровень толерантности к отрицательным температурам, оценено распределение пула транскриптов по семействам внутри путей основных клеточных процессов (рис. 3) и проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов.

Среди общих для исследованных штаммов экспрессирующихся генов семейства «Метаболизм» присутствовали гены энергетического метаболизма; катаболизма аминокислот, липидов, нуклеотидов и углеводов; биосинтеза аминокислот, гликана, липополисахаридов, поликетидов, ненасыщенных жирных кислот и фолата; поглощения/мобилизации железа; превращения пентозы и глюкуроната – т.е. основных путей метаболизма, обеспечивающих жизнеспособность клетки. У всех штаммов присутствовали транскрипты гена *glnA* глутаминсинтетазы, у ST 46 – гена ПИ уридилтрансферазы, активируемых в ответ на азотное голодание. Интересно, что у штамма ST 46 экспрессировались гены всех ключевых ферментов синтеза и деполимеризации поли-β-гидроксибутирата (ПГБ): *phbA*, *phbB*, *phaC*, *phaP*, *phaZ* – и двух ПГБ-дегидрогеназ (гомологи BPSS0017 и BPSS0354), а у штаммов ST 85 и ST 70 – только двух ферментов синтеза ПГБ: *phbA* и *phbB*. У штамма ST 46 наблюдалась экспрессия всех генов основного (гомологи BPSL2309 – BPSL2312) и дополнительного (BPSS1156 – BPSS1159) оперонов респираторной нитратредуктазы *narGHJI*, тогда как у двух других штаммов – только гена *narI* дополнительного оперона. У штаммов ST 85 и ST 70, в отличие от ST 46, экспрессировался ген периплазматической аспарагиназы (BPSS2060); только у ST 70 – протеин-метионин-сульфоксидредуктазы MsrP (BPSL3178).

Из семейства «Мембранный транспорт» у всех штаммов экспрессировались гены белков общего секреторного пути (*gspG*, *gspF*), ABC-транспортеров, эффлюкса катионов и сахаров, системы секреции 3-го типа, регуляторных белков двухкомпонентных систем, в том числе системы Quorum Sensing (QS), кластер генов биосинтеза и экспорта капсульного полисахарида и отдельные мембранные белки. Интересно, что у наиболее толерантного к холоду штамма ST 70 общий для всех трех штаммов набор экспрессируемых генов этого семейства дополняется всего двумя: MFS-транспортера (BPSS1215) и TroA-подобного белка (BPSS0242) – компонента ABC-транспортера сидерофоров трехвалентного железа. У штамма ST 46 дополнительно экспрессировались гены белков общего секреторного пути (*gspD*, *gspE*, *gspC*, *gspH*, *gspJ*, *gspK*, *gspL*, *gspM*, *gspN*), ABC-транспортеров аминокислот (BPSS1423–BPSS1426, *livM* и *livG*), фосфоната (*phnC* и *phnL*), дипептидов (*dppB*, *dppC*, *dppD* и *dppF*), сульфатов (*cysA*, *cysW*, *cyst*) и MFS-транспортеров (BPSL2737

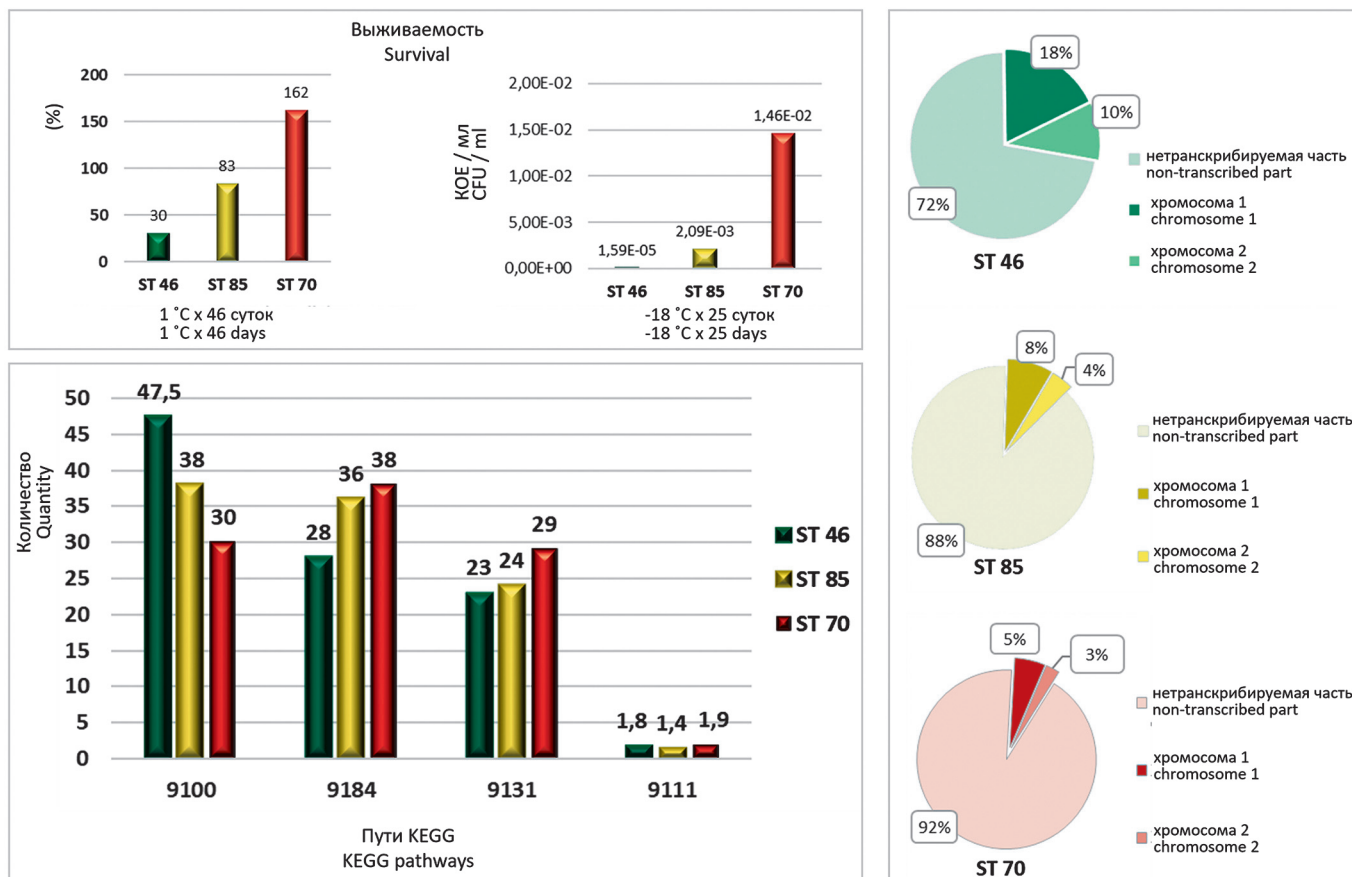


Рис. 2. Выживаемость штаммов *B. pseudomallei* при пониженных температурах в зависимости от распределения пула транскриптов по хромосомам и основным путям KEGG: 9100 «Метаболизм», 9184 «Сигнальные и клеточные процессы», 9131 «Мембранный транспорт», 9111 «Биодеградация антибиотиков и метаболизм»

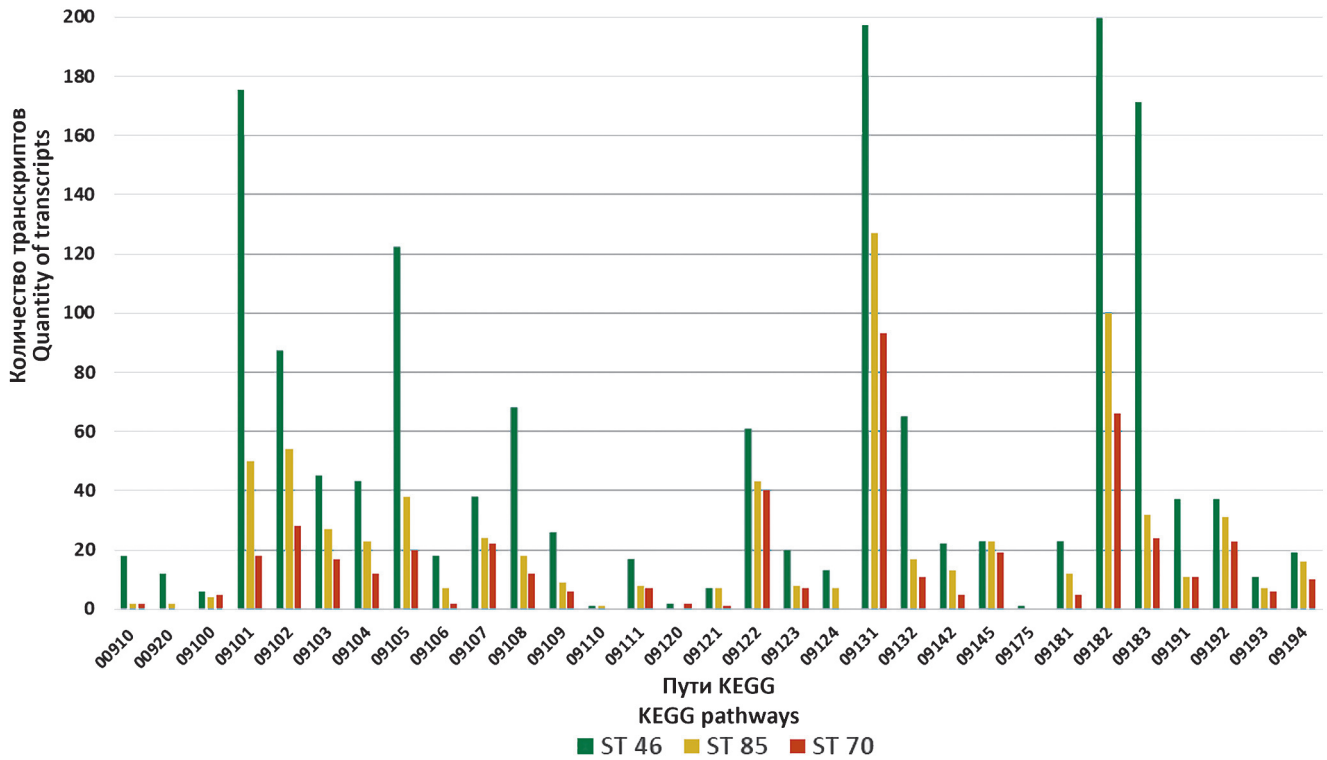
Fig. 2. Survivability of *B. pseudomallei* strains at low temperatures depending on the distribution of the transcript pool across chromosomes and main KEGG pathways: 9100 Metabolism, 9184 Signaling and cellular processes, 9131 Membrane transport, 9111 Antibiotics biodegradation and metabolism

и BPSL2620) и опероны эффлюкс-насосов семейства RND (AmrAB-OprA и VreAB-OprB).

Среди семейства «Белки сигнальных и клеточных процессов» у всех трех штаммов экспрессировались белки репликации, транскрипции и отдельные белки, связанные с репарацией; белки холодового шока – РНК-шапероны CspA и CspD (BPSL0898, BPSL2557, BPSL3079, BPSS1364) и DEAD-бок РНК-хеликазы RhlE2, рибосомный фактор (*rbfA*), при низких температурах придающий рибосомам способность к трансляции мРНК, не связанных с холодовым шоком, HNS-подобные ДНК-связывающие белки, факторы инициации трансляции IF1, IF2 и IF3 (*infA*, *infB*, *infC*), RecA, триггер-фактор PPI (пептидилпролил-цис-транс-изомераза); белок теплового шока Hsp20 (BPSL2918); белки окислительного стресса (OxyR и BPSS1839); окислительного (BPSS1839) и общего стресса (BPSL0520, BPSL2189, гуанозинпирофосфогидролаза SpoT, белок, содержащий NUDIX-домен, фактор DksA, усиливающий эффект (p)ppGpp-зависимой регуляции транскрипции); транскрипционные регуляторы семейств GntR, LacI, MerR, AraC. У штаммов ST 46 и ST 85 дополнительно экспрессировались транскрипционные регуляторы семейств PadR и TetR, у ST 46 – транскрипционные регуляторы семейств AsnC, LuxR, LysR, Fis, Fur

и Crp/Fnr. Кроме того, у штамма ST 46 обнаружены транскрипты других белков холодового (NusA) и теплового шока – еще четырех Hsp20 (гомологи BPSL1322, BPSL1323, BPSL2917 и BPSS2288), HtpG, HslR, Hsp33, GrpE и HrcA, а также шаперонов ClpB, DnaK, GroEL и ко-шаперонина GroES; белков общего (BPSS0032, BPSS1140, GTP пирофосфокиназы RelA, NUDIX-гидролазы MutT) и осмотического (OsmC) (BPSS1361) стресса. Только у штамма ST 70 экспрессировался ДНК-связывающий белок HU (BPSL0004).

Необходимо отметить, что в условиях описываемого эксперимента бактерии, помимо холодового стресса, испытывали ограничения по питательным веществам, что отразилось в экспрессии всеми штаммами перечисленных выше белков общего стресса и глутаминсинтетазы. Штамм ST 46 дополнительно экспрессировал универсальные стрессовые белки UspA, RelA и MutT. Белки семейства UspA у *E. coli* увеличивают уровень выживаемости при пролонгированных стрессовых воздействиях различной природы [13]. RelA – это связанный с рибосомами белок, синтезирующий сигнальные молекулы строгого ответа гуанозинтетрафосфат и гуанозинпентафосфат ((p)ppGpp), накопление которых приводит к переключению клетки с режима роста и пролиферации на



00910 Nitrogen metabolism	09105 Amino acid metabolism	09122 Translation	09181 Protein families: metabolism
00920 Sulfur metabolism	09106 Metabolism of other amino acids	09123 Folding, sorting and degradation	09182 Protein families: genetic information processing
09100 Metabolism	09107 Glycan biosynthesis and metabolism	09124 Replication and repair	09183 Protein families: signaling and cellular processes
09101 Carbohydrate metabolism	09108 Metabolism of cofactors and vitamins	09131 Membrane transport	09191 Unclassified: metabolism
09102 Energy metabolism	09109 Metabolism of terpenoids and polyketides	09132 Signal transduction	09192 Unclassified: genetic information processing
09103 Lipid metabolism	09111 Xenobiotics biodegradation and metabolism	09142 Cell motility	09193 Unclassified: signaling and cellular processes
09104 Nucleotide metabolism	09120 Genetic Information Processing	09145 Cellular community - prokaryotes	09194 Poorly characterized
09105 Amino acid metabolism	09121 Transcription	09175 Drug resistance	

Рис. 3. Распределение пула транскриптов штаммов *B. pseudomallei* по семействам внутри путей KEGG

Fig. 3. Distribution of the pool of transcripts of *B. pseudomallei* strains by families within the KEGG pathways

режим выживания [14]. NUDIX-гидролаза MutT снижает концентрацию (p)ppGpp, что частично компенсирует эффект строгого ответа [15]. Вероятно, экспрессия штаммом ST 46 NUDIX-гидролазы MutT является одним из ключевых факторов, обуславливающих наиболее низкий среди исследованных штаммов уровень подавления транскрипционной активности.

Известно, что HrcA является репрессором индукции генов теплового шока, связываясь с CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression), присутствующими в их промоторах [16]. Тем не менее у *B. pseudomallei* ST 46 наблюдалась одновременная экспрессия *hrcA* и широкого набора генов теплового шока, включая опероны *dnaK* и *groESL*. В условиях нормальной температуры подобный эффект – одновременное присутствие высоких уровней HrcA и GroEL – был отмечен у *B. pseudomallei* при солевом стрессе [17]. Можно предположить, что в этих двух случаях задействован механизм титрования шаперонов. При физиологических температурах шапероны удерживают большинство репрессоров транскрипции генов теплового шока в их активной конформации или секвестрируют сигма-факторы. В условиях пониженных температур или высокой

осмолярности не исключено появление в клетках денатурированных белков, титрующих шапероны. Как следствие, HrcA остается в неактивной конформации, а сигма-факторы связываются с кор-ферментом РНК-полимеразы.

У всех исследованных штаммов экспрессировались альтернативные сигма-факторы РНК-полимеразы: σ^{32} (RpoH), RpoS и RpoE, – но только у штамма ST 46 присутствовал транскрипт гена периплазматической сериновой эндопротеазы семейства DegQ (гомолог BPSL2433), необходимой для активации RpoE. Известно, что сигма-фактор RpoE играет важную роль в адаптации *B. pseudomallei* к осмолярному и тепловому стрессам, а также в формировании биопленок [18, 19]. Вероятно, экспрессия более широкого круга белков теплового шока у штамма ST 46 по сравнению с двумя другими исследованными штаммами обусловлена наличием активной формы RpoE. В пользу данного предположения свидетельствует недавно описанная модель регуляции экспрессии генов теплового шока у *Mycoboccus xanthus* за счет конкурентного связывания HrcA и RpoE с промоторной областью контролируемых генов [20], а также описанный факт неучастия системы HrcA-

CIRCE в индукции теплового шока у *Caulobacter crescentus* [21]. Роды *Caulobacter*, *Burkholderia* и *Mycoboccus*, хотя и относятся к разным классам протеобактерий (альфа, бета и дельта соответственно), имеют определенное сходство в биологических свойствах: являются сапрофитами, способны адаптироваться к широкому диапазону температур, имеют GC-богатые последовательности генома (~69, 68 и 67 % соответственно) и гипотетически могут иметь конвергентное сходство в регуляции ответа на температурный шок.

Из семейства «Биодеградация ксенобиотиков и метаболизм» у всех трех штаммов экспрессировались гены фолдаз (*ppiA*, *dsbA*, *dsbC*), эноил-коэнзим А гидратазы (*pacF*), флавинредуктаз (BPSL1645 и BPSL1646) и металлогидролазы (BPSL3277). У штаммов ST 46 и ST 70 дополнительно экспрессировалась металло-бета-лактамаза класса В (BPSS2119), только у ST 46 – CoA-трансфераза (*pcaI*), гены пенициллинсвязывающих белков (*mrdA*, *mrdA* и BPSL2104) и металлогидролаза (BPSL3277).

После 31 месяца хранения взвесей при температуре около 5 °С штаммы *B. pseudomallei* ST 46 и ST 70 остались жизнеспособными и культивируемыми. Высев хранившихся замороженных взвесей на триптиказосоевый агар с 4 % глицерина (ТСАГ) показал наличие роста у штамма ST 85 и его отсутствие у штаммов ST 46 и ST 70. При микроскопии препаратов раздавленной капли взвесей, не выросших на ТСАГ, наблюдали подвижные клетки, т.е. бактерии были живыми, но перешли в некультивируемую форму. Во всех случаях наблюдали изменение морфологии роста на агаре Эшдауна в сравнении с исходной (рис. 4).

Таким образом, общая тенденция адаптации *B. pseudomallei* к холодovому стрессу связана с регуляторными процессами, приводящими к значительному снижению общей транскрипционной активности при возрастании доли экспрессии генов второй хромосомы, отвечающей за адаптивные функции. При этом обнаружено две стратегии выживания: первая – это модуляция регуляторных процессов, приводящая к подавлению экспрессии генов основных путей метаболизма до минимального уровня, обеспечивающего жизнеспособность клетки, и активация минимально необходимого набора генов стрессового ответа, а вторая – менее выраженное подавление общего метаболизма в сочетании с активацией экспрессии расширенного спектра генов холодovого и теплового шока, общего, осмотического и универсального стрессов. При осуществлении второй стратегии *B. pseudomallei* под воздействием отрицательных температур переходит в жизнеспособное, но некультивируемое состояние быстрее, чем при первой. Тем не менее оба механизма адаптации обеспечивают возбудителю мелиоидоза выживание в условиях длительного холодovого стресса.

Еще в 1993 г. E. Yabuuchi *et al.* призывали переосмотреть точку зрения, что возбудитель мелиоидоза

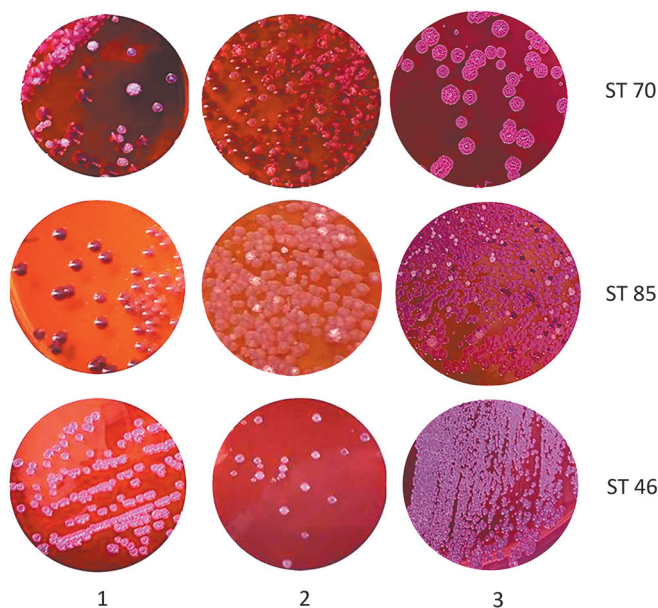


Рис. 4. Динамика изменения морфологии роста штаммов *B. pseudomallei* при воздействии низких температур:

вертикальные ряды: 1 – исходные культуры; 2 – после 25 суток при минус 18 °С и однократного размораживания; 3 – после 31 месяца холодovого стресса; агар Эшдауна, инкубация 4 суток при 37 °С

Fig. 4. Dynamics of changes in the growth morphology of *B. pseudomallei* strains when exposed to low temperatures:

vertical rows: 1 – initial cultures; 2 – after 25 days at minus 18 °C and a single defrosting; 3 – after 31 months of cold stress; Ashdown agar, incubation for 4 days at 37 °C

за является исключительно тропическим обитателем [22]. Проведенное исследование показало, что *B. pseudomallei* обладает высоким потенциалом выживания далеко за пределами известного ареала, что объясняет факты локального распространения и сохранения возбудителя в течение нескольких десятилетий во внешней среде регионов с умеренным климатом.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / Список литературы

1. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1(1):15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
2. Yip T.W., Hewagama S., Mayo M., Price E.P., Sarovich D.S., Bastian I., Baird R.W., Spratt B.G., Currie B.J. Endemic melioidosis in residents of desert region after atypically intense rainfall in central Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(6):1038–40. DOI: 10.3201/eid2106.141908.
3. Chapple S.N.J., Sarovich D.S., Holden M.T.G., Peacock S.J., Buller N., Gollidge C., Mayo M., Currie B.J., Price E.P. Whole-genome sequencing of a quarter-century melioidosis outbreak in temperate Australia uncovers a region of low-prevalence endemicity. *Microb. Genom.* 2016; 2(7):e000067. DOI: 10.1099/mgen.0.000067.
4. Mollaret H.H. “L’affaire du jardin des plantes” ou comment la mélioiidose fit son apparition en France. *Med. Mal. Infect.* 1988; 18(9):643–54. DOI: 10.1016/S0399-077X(88)80175-6.
5. Zakharova I., Chirskov P., Lopasteyskaya Ya., Bui T. Lan Anh, Toporkov A., Viktorov D. Can frozen *Burkholderia pseudomallei* come back to life? *EC Microbiology.* 2021; 17(4):58–63.
6. Phadtare S., Severinov K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol.* 2010; 7(6):788–95. DOI: 10.4161/rna.7.6.13482.

7. Su D., Hao L., Chen F., Li S., Abdelrahman A.M., Zhang Y., Yu H., Liu S., Li M. CspE is overproduced by temperature downshift in the *Acinetobacter johnsonii* DBP-3. *Curr. Microbiol.* 2016; 72(5):563–9. DOI: 10.1007/s00284-015-0979-3.
8. Moser L.A., Ramirez-Carvajal L., Puri V., Pauszek S.J., Matthews K., Dille K.A., Mullan C., McGraw J., Khayat M., Beeri K., Yee A., Dugan V., Heise M.T., Frieman M.B., Rodriguez L.L., Bernard K.A., Wentworth D.E., Stockwell T.B., Shabman R.S. A universal next-generation sequencing protocol to generate noninfectious barcoded cDNA libraries from high-containment RNA viruses. *mSystems.* 2016; 1(3):e00039-15. DOI: 10.1128/mSystems.00039-15.
9. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 2011; 17(1):10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.
10. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prjibelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J. Comput. Biol.* 2013; 20(10):714–37. DOI: 10.1089/cmb.2013.0084.
11. Prjibelski A.D., Vasilinets I., Bankevich A., Gurevich A., Krivosheeva T., Nurk S., Pham S., Korobeynikov A., Lapidus A., Pevzner P.A. ExSPAnDer: a universal repeat resolver for DNA fragment assembly. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):i293–301. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu266.
12. Vasilinets I., Prjibelski A.D., Gurevich A., Korobeynikov A., Pevzner P.A. Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes. *Bioinformatics.* 2015; 31(20):3262–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv337.
13. Nyström T., Neidhardt F.C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol. Microbiol.* 1994; 11(3):537–44. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00334.x.
14. Hauryliuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):298–309. DOI: 10.1038/nrmicro3448.
15. Sanyal R., Vimala A., Harinarayanan R. Studies on the regulation of (p)ppGpp metabolism and its perturbation through the over-expression of nudix hydrolases in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2020; 11:562804. DOI: 10.3389/fmicb.2020.562804.
16. Schumann W. Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress Chaperones.* 2016; 21(6):959–68. DOI: 10.1007/s12192-016-0727-z.
17. Pumirat P., Saetun P., Sinchaikul S., Chen S.T., Korbsrisate S., Thongboonkerd V. Altered secretome of *Burkholderia pseudomallei* induced by salt stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1794(6):898–904. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.01.011.
18. Korbsrisate S., Vanaporn M., Kerdsuk P., Kespichayawattana W., Vattanaviboon P., Kiatpapan P., Lertmemongkolchai G. The *Burkholderia pseudomallei* RpoE (AlgU) operon is involved in environmental stress tolerance and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 252(2):243–9. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.002.
19. Vanaporn M., Vattanaviboon P., Thongboonkerd V., Korbsrisate S. The rpoE operon regulates heat stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 284(2):191–6. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01216.x.
20. Zhuo L., Zhang Z., Pan Z., Sheng D.H., Hu W., Li Y.Z. CIRCE element evolved for the coordinated transcriptional regulation of bacterial duplicate groELs. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2018; 1861(10):928–37. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.08.003.
21. Susin M.F., Perez H.R., Baldini R.L., Gomes S.L. Functional and structural analysis of HrcA repressor protein from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(20):6759–67. DOI: 10.1128/JB.186.20.6759-6767.2004.
22. Yabuuchi E., Wang L., Arakawa M., Yano I. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* strains at 5 degrees C. *Kansenshogaku Zasshi.* 1993; 67(4):331–5. DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.67.331.

Authors:

Zakharova I.B., Chirskov P.R., Ustinov D.V., Viktorov A.D., Shpak I.M., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Захарова И.Б., Чирсков П.Р., Устинов Д.В., Викторов А.Д., Шпак И.М., Топорков А.В., Викторов Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.