

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-127-133

УДК 631.467.2:616.98:579.842.23

М.А. Макашова¹, Е.Г. Оглодин¹, Н.А. Шарапова¹, А.Е. Самойлов², Г.А. Ерошенко¹, В.В. Кутырев¹

Влияние *Yersinia pestis* на почвенных нематод *Panagrolaimus* sp. из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины», Москва, Российская Федерация

Цель – изучение взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенными нематодами, выделенными на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. **Материалы и методы.** В работе использованы флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083 – производный природного штамма филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида – и культура нематод, выделенные на одной территории Горно-Алтайского очага чумы. Систематическую принадлежность нематод определяли по участку гена *18S* рРНК, филогенетический анализ проводили методом Maximum Likelihood на основе модели Tamura-Nei в программе Mega 7.0. Взаимодействие штамма *Y. pestis* KM2083 и нематод изучали при культивировании на твердой агаровой среде NGM. Наблюдение за нематодами осуществляли с использованием микроскопов Stemi-2000C (Carl Zeiss, Германия) и Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). **Результаты и обсуждение.** Установлено, что использованные в работе нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы относятся к роду *Panagrolaimus*. Культивирование нематод на газоне штамма *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT в течение 24 ч не привело к сокращению продолжительности жизни нематод по сравнению с контрольным образцом, что свидетельствует об отсутствии токсичности использованного штамма по отношению к нематодам *Panagrolaimus*. На кутикуле нематод отмечено образование биопленки в области половых органов и хвоста, в пищеварительном тракте наблюдали скопления флуоресцентных клеток возбудителя чумы. Полученные данные могут свидетельствовать о способности нематод к переносу возбудителя чумы в почвенном биоценозе.

Ключевые слова: возбудитель чумы, Горно-Алтайский высокогорный очаг чумы, почвенные нематоды.

Корреспондирующий автор: Макашова Марина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Шарапова Н.А., Самойлов А.Е., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Влияние *Yersinia pestis* на почвенных нематод *Panagrolaimus* sp. из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:127–133. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-127-133
Поступила 03.03.2023. Принята к публ. 13.04.2023.

М.А. Makashova¹, E.G. Oglodin¹, N.A. Sharapova¹, A.E. Samoilov², G.A. Eroshenko¹, V.V. Kutyrev¹

Effect of *Yersinia pestis* on the Soil Nematodes *Panagrolaimus* sp. from the Gorno-Altai High-Mountain Focus of Plague

¹Russian Reserach Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study interaction of *Yersinia pestis* with soil nematodes isolated on the territory of the Gorno-Altai high-mountain plague focus. **Materials and methods.** We used the fluorescent *Y. pestis* strain KM2083, a derivative of the natural strain of the 4.ANT phylogenetic line, the antique biovar of the main subspecies, and a nematode culture isolated in the same area of the Gorno-Altai plague focus. The taxonomy of nematodes was determined by the region of the *18S* rRNA gene; phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model in the Mega 7.0 software. The interaction of the *Y. pestis* KM2083 strain and the nematodes was studied during cultivation on a solid NGM agar medium. Nematodes were observed using microscopes Stemi-2000C (Carl Zeiss, Germany) and Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). **Results and discussion.** It has been established that the nematodes from the Gorno-Altai high-mountain plague focus used in the work belong to the genus *Panagrolaimus*. Cultivation of nematodes on the lawn of the *Y. pestis* strain of the main subspecies of antique biovar, the 4.ANT phylogenetic line for 24 hours did not lead to a reduction in the lifespan of nematodes compared to the control sample, which indicates the absence of toxicity of the used strain towards *Panagrolaimus* nematodes. On the cuticle of nematodes, the formation of a biofilm in the genital area and tail has been noted, and accumulations of fluorescent cells of the plague pathogen observed in the digestive tract. The data obtained can indicate the ability of nematodes to carry the plague pathogen in the soil biocoenosis.

Key words: plague agent, Gorno-Altai high-mountain plague focus, soil nematodes.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Marina A. Makashova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Makashova M.A., Oglodin E.G., Sharapova N.A., Samoilov A.E., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Effect of *Yersinia pestis* on the Soil Nematodes *Panagrolaimus* sp. from the Gorno-Altai High-Mountain Focus of Plague. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 2:127–133. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-127-133

Received 03.03.2023. Accepted 13.04.2023.

Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>

Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Sharapova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>

Samoilov A.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8284-3164>

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Механизмы сохранения *Yersinia pestis* в течение длительных межэпизоотических периодов и взаимодействия возбудителя чумы с членами почвенных биоценозов остаются малоизученными. Во время эпизоотий возбудитель чумы попадает в почву из трупов павших животных, блох и их экскрементов. Одними из первых в процесс деструкции органических остатков включаются почвенные нематоды, населяющие почву в больших количествах. В связи с возможностью взаимодействия нематод с *Y. pestis* в почве актуальным является изучение их взаимоотношений и определение возможной роли почвенных нематод как резервуаров чумной инфекции. Широко известен пример ассоциации энтомопатогенных нематод *Heterorhabditis* и *Steinernema* с бактериями *Photorhabdus* и *Xenorhabdus*, которые играют ключевую роль в патогенезе и гибели насекомых, пораженных нематодами [1].

Установлено, что возбудитель чумы может оказывать патогенное воздействие на нематод, используя два различных механизма. Показано, что образование биопленки *Y. pestis* на кутикуле нематод *Caenorhabditis elegans* в области головы блокирует питание и приводит к их гибели [2, 3]. За образование биопленки у возбудителя чумы отвечает оперон *hmsHFRS*, расположенный в хромосомной области пигментации. В случае утраты этой области или потери функциональности генов оперона *hmsHFRS* за счет единичных мутаций возбудитель чумы теряет способность к биопленкообразованию [2, 3]. Также описан не зависящий от биопленки механизм гибели нематод, основанный на токсическом действии продуктов чумного микроба, накапливающихся в кишечнике круглых червей [4]. Установлено, что мутации в генах *ompT*, *y3857*, *yapH*, ассоциируемых с вирулентностью *Y. pestis*, а также в гене *y1324* белка внешней мембраны Ail и в генах *y0340*, *y1021*, *y2663*, *y3913*, *y0941*, *y4018* снижают вирулентность штаммов возбудителя чумы для *C. elegans* [4, 5]. Отсутствие в геноме штаммов *Y. pestis* плазмид *pCad*, *pPst*, *pFra*, напротив, не влияет на степень патогенности в отношении нематод вне зависимости от биопленкообразования [3, 4].

Существует ряд предположений о том, что зараженные возбудителем чумы нематоды участвуют в активизации эпизоотического процесса в природном очаге. Согласно гипотезе вертикальной трансмиссии нематоды – паразиты блох, зараженные *Y. pestis*, осуществляют перенос возбудителя чумы из почвенного в наземный биоценоз [6]. Рассеивание фрагментов биопленки с кутикулы *C. elegans* с последующим образованием колоний *Y. pestis* в эксперименте предполагает возможность диссеминации возбудителя чумы нематодами и в почвенном биоценозе [7].

Как правило, эксперименты по изучению влияния *Y. pestis* на круглых червей проводят на модельном объекте – нематоде *C. elegans*, в то время как данные о взаимодействии штаммов *Y. pestis* и нематод, выделенных на одном участке природного оча-

га чумы, отсутствуют. Для проведения такого эксперимента целесообразно использование недавно выделенных штаммов возбудителя чумы и нематод из эпизоотически активных природных очагов, одним из которых в настоящее время является Горно-Алтайский высокогорный очаг. Таким образом, **цель** данной работы – выявление особенностей взаимодействия *Y. pestis* с почвенными нематодами, выделенными на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis* и нематод. В работе использован флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083 с включенной в геном плазмидой pTurboGFP-B (ЗАО «Евроген», Россия), производный штамма *Y. pestis* 216 основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT, выделенного в 2017 г. от серого сурка *Marmota baibacina* в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы (координаты: N 49.63350°, E 89.05306°). Образцы почвы для выделения нематод были собраны в 2016 г. из норы серого сурка по методу конверта на участке с ранее зафиксированной эпизоотической активностью Горно-Алтайского высокогорного очага чумы (координаты: N 49.36537°, E 89.05073°). Для выделения нематод 1 г почвы помещали на чашку Петри с агаром NGM [NaCl (3 г), агар (17 г), пептон (2,5 г), холестерин – 5 мг/мл в этиловом спирте (1 мл), 1 М буфер КРО₄, pH 6,0 – 108,3 г КН₂РО₄, 35,6 г К₂НРО₄, Н₂О до 1 литра (1 мл), 1 М MgSO₄ (1 мл), 1 М CaCl₂ (1 мл), долить дистиллированной водой до литра], с газом *Escherichia coli* OP50 и инкубировали при температуре 22 °С и влажности 60 % в климатической камере KBF 115 (Binder, Германия), наблюдая за выходом нематод из почвы на поверхность агара. Отдельных особей перемещали на новые чашки Петри с газом *E. coli* OP50. Очистку от посторонней микрофлоры проводили последовательным пересевом нематод, а также отмывкой яиц с использованием глутарового альдегида [8].

Систематическое определение нематод.

Выделение генетического материала из 10 взрослых особей нематод проводили комплектом реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-Д» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в приборе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) получали фрагменты гена рРНК малой субъединицы рибосомы при использовании праймеров SSU18A (5'AAAGATTAAGCCATGCATG3') и SSU26 (5'CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG3') [9] и комплекта реактивов для ПЦР (Thermo Scientific, США). Капиллярное секвенирование ампликонов выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с нуклеотидны-

ми последовательностями простейших из базы данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLAST. Множественное выравнивание последовательностей проводили алгоритмом MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>), из анализа были исключены короткие последовательности. Филогенетический анализ выполняли в программе Mega 7.0 (метод Maximum Likelihood, модель Tamura-Nei с бутстреп-подкреплением 500 повторов).

Анализ влияния возбудителя чумы на почвенных нематод. Штамм возбудителя чумы культивировали на твердой питательной среде LB при 28 °C в течение 48 ч. В качестве контрольного образца в эксперименте использовали лабораторный штамм *E. coli* OP50, выращивая его при 37 °C на протяжении 24 ч. Бактериальные суспензии готовили в физиологическом растворе в концентрации 10⁹ КОЕ/мл, наносили 0,1 мл на чашку Петри (диаметр 90 мм) с агаром NGM и инкубировали при 22 °C и влажности 60 % в течение 24 ч. Затем на бактериальные газоны переносили нематод на стадии L4 в количестве 20 шт. Совместное культивирование проводили в климатической камере при 22 °C и влажности 60 %, имитируя условия почв. Через 24 ч нематод индивидуально переносили на новые чашки Петри диаметром 55 мм с газоном *E. coli* OP50 на агаре NGM под контролем стереомикроскопа Stemi-2000C (Carl Zeiss, Германия). Количество живых и погибших нематод подсчитывали ежедневно, нематоду считали мертвой при отсутствии реакции на изменение освещения и прикосновение. Образцы просматривали при использовании микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Построение графика и анализ выживаемости нематод осуществляли в программе PRISM (версия 9.5.0). Расчет выживаемости проводили методом Каплана – Мейера, для сравнения кривых выживаемости использовали логарифмический ранговый критерий (Мантела – Кокса). Кривую выживаемости экспериментального образца считали значимо отличающейся от контрольной при величине *p*-уровня значимости <0,05.

Результаты и обсуждение

Определение систематической принадлежности нематод. Из почвы норы серого сурка путем культивирования на питательной среде NGM была получена аксеническая культура свободноживущих нематод. Для установления их систематической принадлежности амплифицировали участок гена 18S рРНК, используя праймеры SSU18A и SSU26 [9], затем определяли нуклеотидную последовательность методом капиллярного секвенирования.

При сравнении полученного участка длиной 922 п.н. с имеющимися в базе данных NCBI GenBank последовательностями ДНК наибольший процент идентичности (97,79 % при 97 % покрытии последовательности) выявлен для гена РНК ма-

лой субъединицы рибосомы нематоды *Panagrolaimus* sp. 4164 (№ доступа MK301117.1) [10]. В соответствии с процентом гомологии нуклеотидной последовательности анализируемая культура нематод относится к роду *Panagrolaimus*. В целях уточнения систематической принадлежности использован набор из 23 нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов нематод, относящихся к семейству Panagrolaimidae. Для укоренения была взята последовательность гена 18S рРНК *Strongyloides stercoralis* (№ доступа M84229.1), входящей в один инфраотряд Panagrolaimomorpha с исследуемыми нематодами [10].

По данным проведенного филогенетического анализа нуклеотидной последовательности, исследуемая нематода относится к роду *Panagrolaimus* со стопроцентной поддержкой ветви (рис. 1). Известно, что нематоды этого рода являются избирательными бактерио-детритофагами [11] и содержатся в почвах Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в различных типах почв и биоценозов, что свидетельствует о распространенности этих нематод в очаге [12].

Особенность образования биопленки на кутикуле и анализ выживаемости нематод на газоне *Y. pestis*. Для оценки влияния возбудителя чумы на почвенных нематод проводили культивирование нематод рода *Panagrolaimus*, выделенных из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, на газонах флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083, для получения которого использовали природный штамм, выделенный на той же территории, что и нематоды. Использование организмов, полученных из одного биоценоза, приближает эксперимент к реальным природным условиям за счет адаптации организмов к одинаковым условиям обитания.

Штамм *Y. pestis* KM2083 высевали на среду NGM, менее богатую питательными веществами по сравнению с используемой для культивирования возбудителя чумы средой LB, и инкубировали при пониженной температуре 22 °C в целях имитации условий, приближенных к природным и более благоприятных для нематод. На выросшие газоны *Y. pestis* помещали нематод и оставляли на 24 ч, после чего нематод переносили на газоны с *E. coli* OP50. Инкубация нематод с возбудителем чумы в течение суток является достаточной для колонизации *C. elegans* [4].

По окончании эксперимента на кутикуле образовывалась биопленка на половых органах (рис. 2, А) и на кончике хвоста (рис. 2, В), которая не мешала нематодам свободно передвигаться по поверхности агара. Также внутри нематод в кишечном тракте наблюдали скопления групп флуоресцентных клеток *Y. pestis* (рис. 2, С). Ранее при культивировании нематод отрядов Tylenchida и Rhabditida, выделенных из почв природных очагов чумы Прикаспия (Прикаспийский песчаный, Волго-Уральский степной и Прикаспийский Северо-Западный степной очаги чумы), на газонах возбудителя чумы также

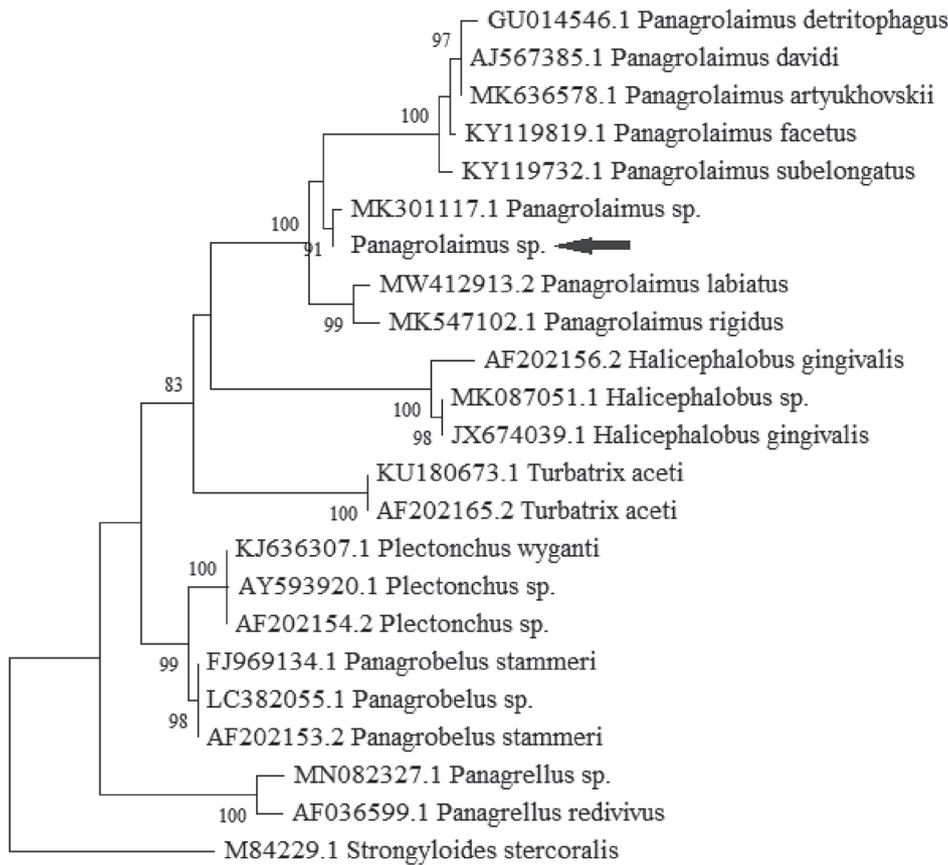


Рис. 1. Филогенетический анализ нематод *Panagrolaimus*, выделенных из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, на основе нуклеотидной последовательности участка гена 18S рРНК (программа Mega 7.0, метод Maximum Likelihood, модель Tamura – Nei). Нуклеотидная последовательность нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага отмечена стрелкой. Рядом с ветвями показаны значения бутстреп-подкрепления, превышающие 75 %

Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Panagrolaimus* nematodes isolated from the soil of the Gorno-Altai high-mountain plague focus, based on the nucleotide sequence of the 18S rRNA gene region (Mega 7.0 software, Maximum Likelihood method, Tamura-Nei model). The nucleotide sequence of the nematode from the Gorno-Altai high-mountain focus is marked with an arrow. Bootstrap reinforcement values greater than 75 % are shown next to the branches

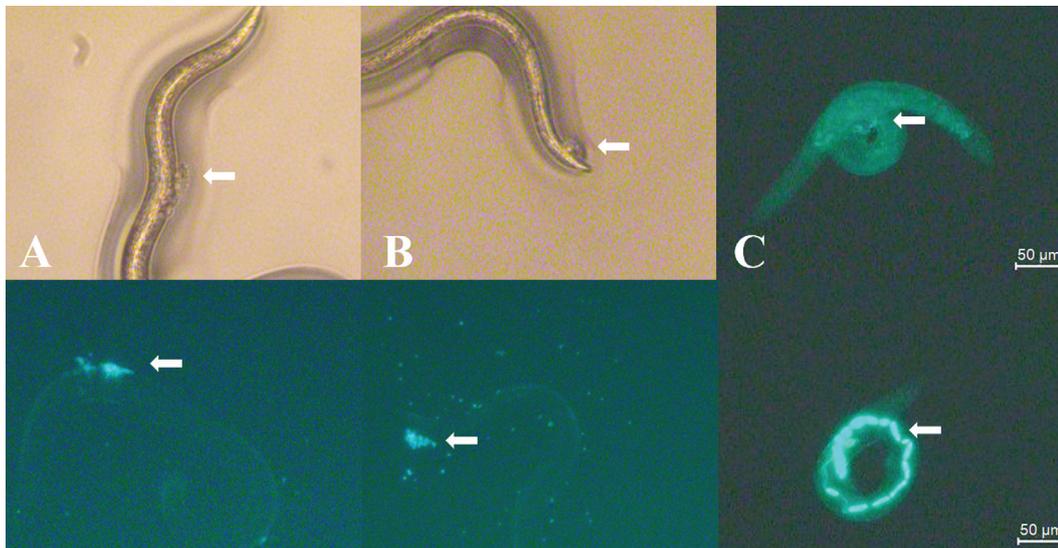


Рис. 2. Скопления клеток флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 в виде биопленки на вульве (А) и хвосте (В) нематод *Panagrolaimus* sp., и групп клеток *Y. pestis* внутри кишечного тракта нематоды (С). Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия)

Fig. 2. Clusters of cells of the fluorescent *Y. pestis* strain KM2083 in the form of a biofilm on the vulva (A) and tail (B) of the nematode *Panagrolaimus* sp., and groups of *Y. pestis* cells inside the intestinal tract of the nematode (C). Microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany)

наблюдали образование биопленки на половых органах нематод [7]. В качестве одного из морфологических проявлений, характерных для инфицированных возбудителем чумы нематод, было описано вздутие и опухание хвоста [4]. Возможно, что образование биопленки на хвосте, выявленное в настоящем исследовании, связано с этим эффектом, а именно со способностью клеток *Y. pestis* к адгезии в этой об-

ласти. Во многих исследованиях обращается внимание на образование биопленки на головной области *C. elegans*, последствием которого является гибель нематоды [3, 13], однако в данном исследовании для нематод *Panagrolaimus* этого явления не наблюдали.

По результатам изучения выживаемости нематод *Panagrolaimus* sp., культивированных на газоне штамма *Y. pestis* KM2083, установлено отсутствие

влияния штамма возбудителя чумы на продолжительность жизни нематод. Об этом свидетельствует р-уровень значимости, равный 0,35 и значительно превышающий допустимый уровень ($p < 0,05$), что указывает на отсутствие значимых статистических различий между кривыми выживания контрольного (нематоды культивированы на газоне *E. coli* OP50) и экспериментального (нематоды культивированы на газоне *E. coli* OP50) образцов (рис. 3).

По данным литературы, при культивировании *C. elegans* N2 в течение 24 ч на газоне штамма *Y. pestis* KIM5, лишенного оперона *hmsHFRS*, с последующим переносом нематод на газон *E. coli* OP50 к 8-му дню эксперимента большинство нематод погибало. При увеличении времени культивирования нематод на газоне *Y. pestis* KIM5 до 8 суток скорость гибели нематод оставалась такой же, время гибели 50 % особей *C. elegans* N2 составляло $(3,63 \pm 0,27)$ дня [4]. Аналогичную динамику гибели *C. elegans* N2 наблюдали при непрерывном культивировании в течение 10 суток на газоне штамма *Y. pestis* KIM8-E и его производных, лишенных оперона *hmsHFRS* [5]. В обеих работах подавляющее большинство инфицированных возбудителем чумы нематод погибали к 7–10-му дню, в то время как на момент окончания нашего эксперимента более 50 % особей оставались жизнеспособными, что может свидетельствовать об отсутствии токсического влияния возбудителя чумы либо о незначительном влиянии на нематод. Показано, что при питании на бактериальных колониях почвенные нематоды могут распространять бактерии во время передвижения как при испражнении непереваренных бактериальных клеток, так и посредством отсоединения клеток, прилипших к поверхности тела червя [14]. Учитывая высокую долю жизнеспособных нематод после контакта с *Y. pestis*, различные механизмы диссеминации бактериальных клеток круглыми червями, а также высокую подвижность нематод (скорость движения *C. elegans* N2 на питательной среде

колеблется от $[31 \pm 4]$ мкм/с в присутствии пищи до $[219 \pm 29]$ мкм/с при ее отсутствии [15]), можно предположить, что нематоды достаточно активно распространяют *Y. pestis* в почвенном субстрате.

Для выяснения причин полученных различий в воздействии возбудителя чумы на почвенных нематод с данными литературы нами проведена оценка структурно-функционального состояния известных генов, предположительно участвующих в токсическом механизме гибели нематод, в геноме используемого флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083. При сравнении последовательностей этих генов *ompT* (*ycoA*), *y3857*, *yapH*, *y1021*, *y0340*, *y2663*, *y3913*, *y0941*, *y4018* [4, 5] по геному *Y. pestis* KIM10+ (ID NCBI GenBank: NC 004088.1) с полногеномной последовательностью штамма *Y. pestis* KM2083 единичных замен нуклеотидов, инсерций или делеций в них не обнаружено.

Использованный в этой работе штамм *Y. pestis* KM2083 относится к штаммам основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT, для которой характерно присутствие в составе генома плазмиды pTP33 [16–18]. При изучении влияния плазмиды pTP33 на эффективность биоуплотнения в блохах выявлено увеличение частоты образования и размера биоуплотнения [19]. В результате проведенного ранее структурного анализа этой плазмиды установлено, что у части последовательностей выявлен уровень гомологии 46–76 % с участками генов фагов бактерий-симбионтов (рода *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* и *Sodalis*) энтомопатогенных нематод [18]. В связи с этим наиболее вероятно, что внедрение фага в клетку предковой формы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT произошло во время нахождения бактерий внутри круглых червей, что также косвенно подтверждает отсутствие выраженного токсического действия на нематод.

Очевидно, что сохранение генов, участвующих в образовании биоуплотнения, необходимо для выживания возбудителя в природных очагах чумы, так как без этой способности штаммы *Y. pestis* не смогут эффективно использовать эктопаразитов для трансмиссии инфекции из-за отсутствия образования блока в преджелудке блох. Кроме того, образование биоуплотнения возбудителя чумы на поверхности тела нематод и сохранение бактериальных клеток в пищеварительном тракте может приводить как к распространению бактерий нематодами в пределах почвенного биоценоза, так и к выносу в наземный биоценоз посредством инфицирования *Y. pestis* свободноживущих бактериоидных на личиночной стадии энтомопаразитических нематод – паразитов блох [6].

Таким образом, в результате исследования свободноживущих нематод, выделенных из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага, определена их систематическая принадлежность к роду *Panagrolaimus*. При изучении влияния культивирования нематод этого рода на газоне штамма *Y. pestis* KM2083 филогенетической линии 4.ANT продолжи-

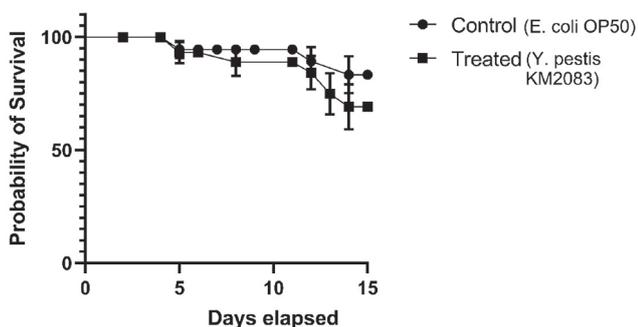


Рис. 3. Выживаемость нематод *Panagrolaimus* sp. при культивировании на газоне *Y. pestis* KM2083 (в течение 24 ч) с последующим переносом на газон *E. coli* OP50. В качестве контрольного образца использованы нематоды, на протяжении всего периода времени культивированные на газоне *E. coli* OP50

Fig. 3. Survivability of nematodes *Panagrolaimus* sp. when cultivated on the lawn of *Y. pestis* KM2083 (for 24 hours) with subsequent transfer to the lawn of *E. coli* OP50. Nematodes cultivated on the lawn of *E. coli* OP50 throughout the entire time period were used as a control sample

тельность жизни *Panagrolaimus* не отличалась от таковой у особей, культивируемых на газоне *E. coli* OP50. При микроскопии образцов на кутикуле нематод отмечали образование биопленки возбудителя чумы в области хвоста и половых органов нематод, в то время как в кишечнике наблюдали конгломераты и единичные клетки *Y. pestis*. Более длительная продолжительность жизни нематод, выявленная в этой работе, по сравнению с данными по совместному культивированию модельных нематод *C. elegans* на газонах штаммов возбудителя чумы, может свидетельствовать о наличии коадаптаций организмов, выделенных из одного биоценоза, и возможной роли нематод как в распространении клеток *Y. pestis* в пределах почвенного биоценоза, так и в выносе клеток бактерий в наземную экосистему согласно гипотезе вертикальной трансмиссии. Дальнейшее изучение взаимодействий возбудителя чумы с нематодами, в том числе влияния на продолжительность жизни круглых червей и возможности сохранения бактериальных клеток в нематодах, позволит оценить роль нематод в жизненном цикле *Y. pestis* и в инициации эпизоотического процесса в природных очагах чумы.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Goodrich-Blair H., Clarke D.J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol. Microbiol.* 2007; 64(2):260–8. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x.
2. Darby C., Hsu J.W., Ghori N., Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* 2002; 417(6886):243–44. DOI: 10.1038/417243a.
3. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Изучение образования биопленки у беспиgmentных и бесплазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; 3:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
4. Styer K.L., Hopkins G.W., Bartra S.S., Plano G.V., Frothingham R., Aballay A. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep.* 2005; 6(10):992–7. DOI: 10.1038/sj.embor.7400516.
5. Bartra S.S., Styer K.L., O'Bryant D.M., Nilles M.L., Hinnebusch B.J., Aballay A., Plano G.V. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect. Immun.* 2008; 76(2):612–2. DOI: 10.1128/IAI.01125-07.
6. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2009; 4:6–13.
7. Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Особенности образования биопленки у штаммов *Yersinia pestis* основного и не основных подвидов. *Инфекционные болезни.* 2012; 10(S1):201.
8. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974; 77(1):71–94. DOI: 10.1093/genetics/77.1.71.
9. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* 1998; 392(6671):71–5. DOI: 10.1038/32160.

10. Holterman M., Schratzberger M., Helder J. Nematodes as evolutionary commuters between marine, freshwater and terrestrial habitats. *Biol. J. Linn. Soc.* 2019; 128(3):756–67. DOI: 10.1093/biolinnean/blz107.

11. Гагарин В.Г. Свободноживущие нематоды пресных вод России и сопредельных стран: Фауна и пути ее формирования, экология, таксономия, филогения. М.: Наука; 2001. 170 с.

12. Сушук А.А., Матвеева Е.М., Калинин Д.С., Юркевич М.Г. Сообщества почвенных нематод типичных биоценозов Республики Алтай. *Зоологический журнал.* 2022; 101(10):1083–95. DOI: 10.31857/S0044513422100129.

13. Tan L., Darby C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(4):861–70. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05265.x.

14. Thutupalli S., Uppaluri S., Constable G.W., Levin S.A., Stone H.A., Tarnita C.E., Brangwynne C.P. Farming and public goods production in *Caenorhabditis elegans* populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017; 114(9):2289–94. DOI: 10.1073/pnas.1608961114.

15. Ramot D., Johnson B.E., Berry T.L. Jr, Carnell L., Goodman M.B. The parallel worm tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2208. DOI: 10.1371/journal.pone.0002208.

16. Балахонов С.В., Ценджаев С., Эрдэнэбат А. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1991; 11:27–9.

17. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Гусева Н.П., Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 4:82–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-82-85.

18. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г., Половинкина В.С., Сидорова Е.А., Синьков В.В. Анализ нуклеотидной последовательности криптической плазмиды rTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. *Генетика.* 2016; 52(9):1012–20. DOI: 10.7868/S0016675816090022.

19. Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Влияние плазмидного состава *Yersinia pestis* на образование биопленки в организме блох с разной векторной активностью. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 2:76–83.

References

1. Goodrich-Blair H., Clarke D.J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol. Microbiol.* 2007; 64(2):260–8. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x.
2. Darby C., Hsu J.W., Ghori N., Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* 2002; 417(6886):243–44. DOI: 10.1038/417243a.
3. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Y.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Erokhin P.S., Boiko A.V., Kutyrev V.V. [Studies of biofilm formation in non-pigmented and plasmid-deprived mutants of *Yersinia pestis* on biotic surfaces, *in vivo* and *in vitro* conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (3):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
4. Styer K.L., Hopkins G.W., Bartra S.S., Plano G.V., Frothingham R., Aballay A. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep.* 2005; 6(10):992–7. DOI: 10.1038/sj.embor.7400516.
5. Bartra S.S., Styer K.L., O'Bryant D.M., Nilles M.L., Hinnebusch B.J., Aballay A., Plano G.V. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect. Immun.* 2008; 76(2):612–2. DOI: 10.1128/IAI.01125-07.
6. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of interaction between the plague pathogen and invertebrates]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2009; (4):6–13.
7. Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. [Features of biofilm formation in strains of *Yersinia pestis* of the main and non-main subspecies]. *Infektsionnye Bolezni [Infectious Diseases]*. 2012; 10(S1):201.
8. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974; 77(1):71–94. DOI: 10.1093/genetics/77.1.71.
9. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* 1998; 392(6671):71–5. DOI: 10.1038/32160.

10. Holterman M., Schratzberger M., Helder J. Nematodes as evolutionary commuters between marine, freshwater and terrestrial habitats. *Biol. J. Linn. Soc.* 2019; 128(3):756–67. DOI: 10.1093/biolinnean/blz107.
11. Gagarin V.G. [Free-Living Nematodes of Fresh Waters of Russia and Neighboring Countries: Fauna and Ways of Its Formation, Ecology, Taxonomy, Phylogeny]. Moscow: Nauka; 2001. 170 p.
12. Sushchuk A.A., Matveeva E.M., Kalinkina D.S., Yurkevich M.G. Communities of soil nematodes of typical biocenoses in the Republic of Altai. *Zoologicheskyy Zhurnal [Zoological Journal]*. 2022; 101(10):1083–95. DOI: 10.31857/S0044513422100129.
13. Tan L., Darby C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(4):861–70. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05265.x.
14. Thutupalli S., Uppaluri S., Constable G.W., Levin S.A., Stone H.A., Tarnita C.E., Brangwynne C.P. Farming and public goods production in *Caenorhabditis elegans* populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017; 114(9):2289–94. DOI: 10.1073/pnas.1608961114.
15. Ramot D., Johnson B.E., Berry T.L. Jr, Carnell L., Goodman M.B. The parallel worm tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2208. DOI: 10.1371/journal.pone.0002208.
16. Balakhonov S.V., Tsendzhav S., Erdenebat A. [New plasmidovars of plague pathogen strains isolated in Mongolia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 1991; (11):27–9.
17. Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Odinkov G.N., Guseva N.P., Bugorkova S.A., Kutyrev V.V. [Structural-functional analysis of cryptic plasmids in *Yersinia pestis* strains from two natural plague foci of Russia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):82–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-82-85.
18. Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Tokmakova E.G., Polovinkina V.S., Sidorova E.A., Sin'kov V.V. [Analysis of the nucleotide sequence of *Yersinia pestis* cryptic plasmid pTP33 from the Tuva natural plague focus]. *Genetika [Genetics]*. 2016; 52(9):1012–20. DOI: 10.7868/S0016675816090022.
19. Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V. [Effect of *Yersinia pestis* plasmid composition on biofilm formation in fleas with different vector activity]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; (2):76–83.

Authors:

Makashova M.A., Oglodin E.G., Sharapova N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Samoilov A.E. Research Institute of Systems Biology and Medicine. 18, Nauchny Proezd St., Moscow, 117246, Russian Federation. E-mail: info@sysbiomed.ru.

Об авторах:

Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Шаранова Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Самойлов А.Е. Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины. Российская Федерация, 117246, Москва, Научный проезд, 18. E-mail: info@sysbiomed.ru.