

УДК 579.258+579.222

ПЕРСИСТЕНТНЫЙ ПРОФИЛЬ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ ХЕЛАТОРОВ ЖЕЛЕЗА

© 2025 г. О. В. Бухарин*, Е. В. Иванова, И. А. Здвизкова, Н. Б. Перунова

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук,
ФГБУН ОФИЦ УрО РАН, 460014, Оренбург, Россия

*e-mail: walerewna13@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2024 г.

После доработки 17.10.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

Целью работы является характеристика связи персистентного профиля и способности к продукции железосвязывающих соединений кишечных изолятов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* с генетическими детерминантами *iucBC* и *clbBN*, как на фенотипическом, так и на генетическом уровнях. С использованием сконструированных праймеров и разработанного единого алгоритма мультиплекс-ПЦР установлена широкая частота встречаемости (44.0–80.0%) в популяции условно-патогенных энтеробактерий штаммов с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC*, кодирующих синтез аэробактина и колибактина. Показано, что при наличии в генетическом аппарате энтеробактерий генов *clbBN/iucBC* штаммы проявляли выраженную способность продуцировать железосвязывающие соединения и целый спектр персистентных характеристик (антилизоцимной, антикарнозиновой, антипептидной активности в отношении ФНО α , антииммуноглобулиновой активности в отношении IgM/IgG и биопленкообразования). В геномах секвенированных штаммов *clbBN⁺iucBC⁺* в сравнении со штаммами *clbBN⁻iucBC⁻* выявлены необходимые гены для биосинтеза и транспорта аэробактина, полный перечень генов острова *pks*, а также наличие известных гомологов детерминант ингибиторов лизоцима *Ivy* и *MliC*, *EspP* (*E. coli* M-17) и *PliC*, *LprI* (*K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA). Таким образом, штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* с генетическими детерминантами хелаторов железа — *clbBN* и *iucBC* характеризуются наличием генотипических и фенотипических признаков сидерофоропродукции, протеазной активности в отношении антимикробных факторов хозяина, что позволяет их использовать в качестве маркеров патогенного и персистентного потенциала условно-патогенных энтеробактерий.

Ключевые слова: условно-патогенные энтеробактерии, генетические детерминанты колибактина и аэробактина, персистентный и патогенный потенциал

DOI: 10.31857/S0026365625020042

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* широко распространены в природных эконисах, но подавляющее большинство видов, прежде всего *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, приспособилось к обитанию в кишечнике млекопитающих, в том числе и в кишечнике человека (Егорова и соавт., 2011). Способность энтеробактерий к выживанию и адаптации к различным стрессовым факторам внутренней среды хозяина реализуется как при участии механизмов, направленных на выживание прокариот в конкретном специфическом биотопе, так и процессов, имеющих общий универсальный характер (Бухарин и соавт., 2005; Ермилова и соавт., 2007). Изучение персистенции микроорганизмов в ИКВС УрО РАН

на протяжении последних десятилетий позволило установить, что персистентные свойства широко распространены как среди патогенов, так и представителей симбионтной микробиоты организма человека (Бухарин, 1999; Бухарин и соавт., 2006). И это не случайно, поскольку в биотопе хозяина факторы врожденного иммунитета (лизоцим, лактоферрин, β -дефенсины и др.) постоянно воздействуют на микроорганизмы, и сохранение жизнеспособности их популяции реализуется за счет приобретения устойчивости к защитным механизмам организма человека. Микроорганизмы приобрели целый перечень персистентных характеристик — микробные секретлируемые факторы инактивации защиты хозяина (антилизоцимная,

антилактоферриновая, антикарнозиновая активность и т.д.) (Бухарин, 1999).

Вместе с тем для выживания прокариот в организме хозяина необходимо биологически доступное железо. Это связано с тем, что оно выступает в роли кофактора для многих регуляторных белков и ферментов с редокс-активностью, и для оптимального роста большинства бактерий требуются микромолярные уровни свободного железа (Ермилова и соавт., 2007; Kramer et al., 2020). В организме человека содержатся существенные количества железа, но оно связано с транспортными и запасными белками, такими как трансферрин, ферритин, гемоглобин, а также антимикробными белками — лизоцим, лактоферрин, и в результате уровни свободного железа очень низкие (Новикова, 2011; Ullah, Lang, 2023). В условиях дефицита железа бактерии используют разные стратегии извлечения железа из окружающей среды, где наиболее универсальной формой является синтез специальных внеклеточных хелаторов, обладающих высокой аффинностью к различным ионам металлов, в частности к Fe (III) (Kramer et al., 2020). В настоящее время показана способность энтеробактерий к продукции сидерофоров — энтеробактин, сальмохелин, иерсиниабактин и аэробактин (Searle et al., 2015). Рассматривая различные группы хелатирующих веществ, продуцируемых энтеробактериями, мы сосредоточили внимание в данной работе, прежде всего, на аэробактине и колибактине. Многочисленные исследования продемонстрировали ключевую роль аэробактина в повышенном усвоении железа, даже в штаммах, обладающих всеми четырьмя локусами, кодирующими сидерофоры (Chen et al., 2021). Колибактин — генотоксин РК-NRP принадлежит к тому же семейству химических соединений, что и энтеробактин, сальмохелины и иерсиниабактин, синтез которого одновременно с синтезом сидерофоров обеспечивается кластером поликетидсинтазного генного островка *pks* (Martin et al., 2017; Wami et al., 2021; Bosveli et al., 2023). Причем выработка колибактина, как и сидерофоров, строго контролируется биодоступностью железа через белок-регулятор поглощения железа (*Fur*) и малые некодирующие РНК (*sRNA*) *RyhB* (Garcie et al., 2016; Martin et al., 2017), что позволяет рассматривать данный поликетид как хелатор железа (Бондаренко, Фиалкина, 2012).

Большинство исследований утилизации железа бактериями в организме человека были сосредоточены в основном на патогенах, что позволило установить роль хелатирующих факторов как факторов вирулентности микроорганизмов. Так, было показано, что потеря способности прокариот синтезировать сидерофоры коррелирует с потерей у них вирулентности, что выявлено у бактерий *Erwinia chrysanthemi* (Muller et al., 2022), *Pseudomonas aeruginosa* (Jeong et al., 2023; Kirienko

et al., 2019), *Vibrio anguillarum* (Lages et al., 2019) и др. Однако способность хелаторов захватывать железо можно рассматривать как факторы адаптации и длительного выживания (персистенции) микробной клетки в организме человека, непосредственно способствующие распространению штаммов в природных эконисах (Бухарин и соавт., 2023).

Вместе с тем определение персистентного потенциала кишечных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* с генетическими детерминантами аэробактина (*iucBC*) и колибактина (*clbBN*) может способствовать пониманию аспектов формирования экологических фенотипов штаммов с патогенным и персистентным потенциалом в популяции условно-патогенных энтеробактерий, являющихся на сегодняшний день причиной развития серьезных инфекций организма человека, таких как пневмония, инфекция мочевыводящих путей и сепсис.

Целью настоящего исследования явилась характеристика связи персистентного профиля и способности к продукции железосвязывающих соединений кишечных изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae* с генетическими детерминантами *iucBC* и *clbBN*, как на фенотипическом, так и на генетическом уровнях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили 184 кишечных изолята *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенные при обследовании условно-здоровых лиц на дисбиоз кишечника (штаммы *E. coli*, $n=124$; *K. pneumoniae*, $n=60$), также в работе использованы типовые штаммы бактерий из коллекции ГИСК им Л.А. Тарасевича (*E. coli* М-17 и *E. coli* К-12), ВКПМ ФГУП ГосНИИ “Генетика” (*E. coli* LEGM-18), сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (*K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA). Кишечные культуры идентифицированы с использованием тест-системы Lachema 24 (“Pliva-Lachema”, Чехия) и времяпролетной масс-спектрометрии (Microflex LT, “Bruker Daltonics”, Германия).

Поиск наиболее консервативных участков нуклеотидных последовательностей и подбор праймеров родоспецифичного диапазона для выявления генов, кодирующих синтез генотоксина колибактина (*clbBN*) и сидерофора аэробактина (*iucBC*), осуществлен на основе базы данных GenBank (“National Library of Medicine”, США). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изучаемых генов и предполагаемых продуктов их трансляции был проведен по методу ClustalW с применением

пакета программного обеспечения Lasergene 7.1 (“DNASTAR, Inc.”, США). Верификация специфичности полученных олигонуклеотидов – с помощью сервиса Standard Nucleotide BLAST (“National Library of Medicine”, США). Реакция ПЦР была осуществлена в ДНК-амплификаторе “Терцик МС-2” (Россия) в режиме ускоренного регулирования температуры. Получаемые ампликоны подвергались агарозному гель-электрофорезу (“Bio-Rad”, Sub-Cell GT, США) (Маниатис и соавт., 1984) таким образом, чтобы их отжиг происходил при одном температурном режиме 65°C. Штаммы, обладающие детерминантами аэробактина обозначали как “*iucBC*⁺”, колибактина “*clbBN*⁺”, а их отсутствие “*iucBC*⁻” и “*clbBN*⁻”.

Скрининг микроорганизмов на способность секретировать железосвязывающие соединения (сидерофоры) производился путем посева штаммов на питательный агар, содержащий краситель хромазуrol S (CAS) (“Sigma-Aldrich”, США). Желтый ореол вокруг бактериальной колонии после 48.0–72.0 ч инкубации при 37°C свидетельствовал о продукции сидерофоров (Himpsl et al., 2019). Диаметр зон изменения цвета измеряли с точностью до 1 мм с использованием штангенциркуля. Количественное определение сидерофорных единиц в среде культивирования бактерий проводили с использованием жидкой среды CAS. Поглощение образца и контроля при длине волны 630 нм измеряли после 1 ч инкубации при 24°C. Процентное содержание железосвязывающих соединений в средах культивирования энтеробактерий рассчитывали путем вычитания значений поглощений образца из контроля. Содержание сидерофоров менее 10 единиц считалось отрицательным, и в этом случае не наблюдалось изменения синего цвета раствора CAS (Schwyn et al., 1987).

Изучение персистентных свойств проводилось по общепринятым методикам. Для выявления антилизотимной (АЛА) и антикарнозиновой (АКРА) активностей бактерий использовали фотометрический метод О.В. Бухарина и соавт. (1999). АЛА выражали в мкг/мл ОП₄₅₀, а АКРА – в мг/мл. Антипептидную активность (АПА) в отношении рекомбинантных цитокинов (ФНО-α – T6674-10UG, ИЛ-10 – 19276-5UG) и антииммуноглобулиновую активность (АИГА) бактерий (“Sigma-Aldrich”, США) проводили иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием наборов ООО “Цитокин” (г. Санкт-Петербург) и ЗАО “Вектор-Бест” (г. Новосибирск) соответственно (Бухарин и соавт., 2011). Антипептидную и антииммуноглобулиновую активность выражали в единицах инактивации субстратов в опыте по сравнению с контролем. Образование биопленок (БПО) изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистиролового стерильного планшета (O'Toole et al., 1999).

Полногеномное секвенирование культур *E. coli* M-17 и LEGM-18, *K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA осуществляли с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (“Illumina”, США). Аннотацию и первичный анализ набора генов известных гомологов проводили с помощью online инструментов RAST и AntiSMASH. Аннотация геномов выполнена в автоматическом режиме сервисом PGAP после их депонирования в базе данных NCBI GenBank (“NIH”, США). Результаты были получены путем анализа данных результатов секвенирования и базы данных штаммов *E. coli* K-12 и *K. pneumoniae* MGH 78578.

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0, включая методы параметрического (*t*-критерий Стьюдента), непараметрического (U-критерий Манна–Уитни) анализов. Результаты исследований представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате анализа исследуемых штаммов энтеробактерий на наличие детерминант *clbBN* и *iucBC* методом мультимплекс-ПЦР (рисунок) было установлено, что $80.0 \pm 2.3\%$ кишечных изолятов эшерихий являются носителями генов аэробактина и/или колибактина. Большинство ($36.0 \pm 2.4\%$) исследуемых культур *E. coli* обладали генами, кодирующими синтез колибактина (*clbBN*⁺). В равных долях (по $22.0 \pm 1.6\%$) выявлялись изоляты эшерихий, обладающие генами продукции аэробактина (*iucBC*⁺) и сочетанием генов колибактина и аэробактина (*clbBN*⁺*iucBC*⁺). У клебсиелл изучаемые гены регистрировались у $44.0 \pm 3.5\%$ штаммов и встречались только в сочетании (*clbBN*⁺*iucBC*⁺).

Скрининг энтеробактерий на способность секретировать сидерофоры в условиях голодания по железу с использованием CAS агара показал наличие способности к продукции железосвязывающих соединений у $78.0 \pm 3.4\%$ культур *E. coli*, имеющих генетические детерминанты *clbBN* или *iucBC* или их сочетание, и у двух штаммов *E. coli*, отрицательных по генам *clbBN* и *iucBC*. Данное свойство выявлялось у всех штаммов *K. pneumoniae* с генами *clbBN*/*iucBC* и у $23.0 \pm 1.5\%$ штаммов без исследуемых детерминант. Выявление фенотипической активности секреции железосвязывающих соединений у штаммов, отрицательных по исследуемым генетическим детерминантам может быть связано с продукцией других видов

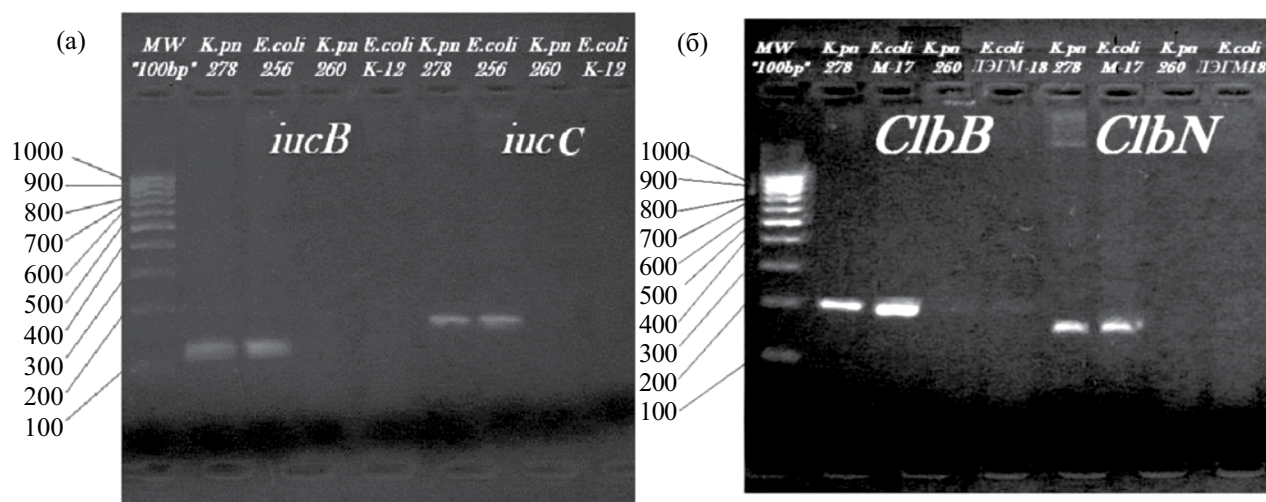


Рисунок. Электрофореграмма результатов разделения ампликонов аэробактина (*iucBC*) (а) и колибактина (*clbBN*) (б) у штаммов энтеробактерий. MW – линейка молекулярных масс.

сидерофоров – энтеробактин, иерсиниабактин (Wami et al., 2021). Анализ измерения диаметра желтых ареолов вокруг штаммов, свидетельствующих о продукции сидерофоров, выявил следующие закономерности: у штаммов с генетическими детерминантами *clbBN* или *iucBC* диаметр составлял 11.0–16.0 мм, а при сочетании обоих этих генов диаметр в среднем достигал 22.0 ± 3.0 мм ($p < 0.05$) (рисунок).

Аналогичные данные были получены при определении единиц продукции сидерофоров эшерихий и клебсиелл с использованием жидкой CAS среды. У штаммов энтеробактерий, не имеющих генов *clbBN* или *iucBC*, установлены низкие значения концентрации сидерофоров в среде культивирования (не более 11 ед.), а наибольшие значения (21 и более ед.) регистрировались у культур, носителей обоих генетических детерминант ($p < 0.05$).

Далее у культур *E. coli* и *K. pneumoniae* с отсутствием/наличием генов *clbBN* и *iucBC* была изучена способность к образованию биопленок и ряд персистентных свойств (АЛА, АПА, АИГА, АКРА). Установлено, что среди исследуемых штаммов, независимо от наличия у них генов *clbBN* и *iucBC*, преобладающее большинство культур образовывали биопленки (в 96.0 ± 3.5 – $97.0 \pm 7.5\%$ случаев), проявляли антилизотимную (в 87.0 ± 6.4 – $98.0 \pm 10.9\%$ случаев) и антипептидную активность в отношении ФНО α (в 73.0 ± 5.3 – $76.0 \pm 6.6\%$ случаев). Штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae*, обладающие генами *clbBN* и *iucBC*, в сравнении с исследуемыми культурами без данных генов чаще проявляли АПА в отношении IL-10 (соответственно 88.0 ± 5.3 и $41.0 \pm 4.7\%$), АКРА (97.0 ± 8.5 и $78.0 \pm 6.2\%$ соответственно) и АИГА в отношении IgG (51.0 ± 7.6 и $4.0 \pm 1.7\%$ соответственно) ($p < 0.05$).

Анализ выраженности биопленкообразования и персистентных свойств исследуемых культур *E. coli* и *K. pneumoniae* позволил установить достоверно более высокие значения уровней БПО, АЛА, АПА в отношении ФНО α , АИГА в отношении IgG и IgM, АКРА у штаммов энтеробактерий *clbBN*⁺*iucBC*⁺ в сравнении со штаммами *clbBN*[−]*iucBC*[−] ($p < 0.05$) (таблица).

Так, у штаммов энтеробактерий *clbBN*⁺*iucBC*⁺ уровни БПО и АЛА были в 2 раза, значения АПА в отношении ФНО α в 2–5 раз, уровни АИГА в отношении IgM/IgG и АКРА в 2–3 раза достоверно выше ($p < 0.05$) значений данных признаков, чем у культур без генетических детерминант *clbBN* и *iucBC*. Исключение составили такие свойства энтеробактерий, как АИГА в отношении IgA и АПА в отношении IL-10, выраженность которых не имела отличий при сравнении культур, обладающих генами *clbBN/iucBC* и не имеющих данных генетических детерминант.

На заключительном этапе работы по результатам скрининга на наличие генов *clbBN* или *iucBC* методом мультиплекс-ПЦР для оценки информативности сконструированных праймеров были отобраны типовые штаммы энтеробактерий для секвенирования их геномов. В качестве типовых штаммов были использованы *E. coli* M-17 и *E. coli* LEGM-18, положительные по генам *iucBC* и отрицательные по наличию генов *clbBN*, кодирующих синтез колибактина, а также штамм *E. coli* K-12, не имеющий исследуемых генетических детерминант. Среди штаммов *K. pneumoniae* для секвенирования были отобраны культуры ICIS-278_PBV и ICIS-277_SVA, носители генов как колибактина, так и аэробактина, в качестве сравнения был использован геном штамма *K. pneumoniae* MGH

Таблица. Персистентный профиль штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* с отсутствием/наличием генов *clbBN* и *iucBC*

Персистентные свойства	<i>E. coli</i> <i>clbBN</i> ⁻ <i>iucBC</i> ⁻ (n=16)	<i>E. coli</i> <i>clbBN</i> ⁺ <i>iucBC</i> ⁺ (n=16)	<i>K. pneumoniae</i> <i>clbBN</i> ⁻ <i>iucBC</i> ⁻ (n=22)	<i>K. pneumoniae</i> <i>clbBN</i> ⁺ <i>iucBC</i> ⁺ (n=16)
	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m
БПО, ед. ОП ₆₃₀	0.14 ± 0.01	0.30 ± 0.02*	0.39 ± 0.01	0.78 ± 0.02**
АЛА, мкг/мл ОП	0.85 ± 0.02	1.94 ± 0.03*	1.1 ± 0.02	1.9 ± 0.04**
АПА ФНОα, ед.	15.0 ± 0.01	76.0 ± 0.03*	37.5 ± 0.01	89.5 ± 0.05**
АПА IL-10, ед.	21.0 ± 0.02	30.0 ± 0.04	25.8 ± 0.02	27.6 ± 0.03
АИГА, ед.	Ig A	22.0 ± 0.03	31.5 ± 0.04	26.5 ± 0.03
	Ig M	16.0 ± 0.03	28.6 ± 0.04*	75.1 ± 0.04**
	Ig G	12.06 ± 0.04	39.3 ± 0.03*	68.3 ± 0.03**
АКрА, мг/мл	0.97 ± 0.01	2.1 ± 0.03*	1.4 ± 0.01	2.2 ± 0.04**

* – $p < 0.05$ в сравнении с группой штаммов *E. coli* (*clbBN*⁻ *iucBC*⁻). ** – $p < 0.05$ в сравнении с группой штаммов *K. pneumoniae* (*clbBN*⁻ *iucBC*⁻).

78578, отрицательного по двум детерминантам. Анализ результатов секвенирования геномов энтеробактерий позволил установить наличие генов биосинтеза и транспорта аэробактина/колибактина у культур *clbBN*⁺ *iucBC*⁺ и их отсутствие у штаммов отрицательных по исследуемым детерминантам. Так, штаммы LEGM-18, *K. pneumoniae* ICIS-278 и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA обладали необходимыми генами для биосинтеза и транспорта аэробактина. Секвенированные штаммы *E. coli* M-17 и *K. pneumoniae* ICIS-278 и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA имели не только гены *clbBN*, определяемые ПЦР-реакцией, но также полный перечень генов острова *pks*.

Учитывая особенности персистентного профиля штаммов с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC*, при обработке данных полногеномного секвенирования типовых штаммов энтеробактерий были установлены известные гомологи детерминант ингибиторов лизоцима, значимые в проявлении широко распространенного среди энтеробактерий персистентного признака – антилизотимная активность (Бухарин, 1999). В результате было установлено, что у всех типовых штаммов *E. coli* M-17, LEGM-18, *K. pneumoniae* ICIS-278 и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA в геноме содержится ген переплазматического ингибитора лизоцима – *Iyu*, а также мембранно-связанный ингибитор лизоцима – *MliC*. Штаммы *E. coli*, носители *Iyu*, имели идентичную последовательность Wp_001308392.1, кодирующую полипептид длиной 148 аминокислотных остатков; носители *MliC* кишечных палочек имеют последовательность Wp_000178045.1 с длиной 109 аминокислотных остатков, у клебсиеллы Wp_002907744.1 – с длиной 107 аминокислотных остатков.

Кроме того, анализ данных генома показал, что у штаммов с генетическими детерминантами

колибактина, а также их сочетаний с аэробактином содержатся в генетическом аппарате еще по одному гену из четырех известных детерминант ингибитора лизоцима. В геноме у штамма *E. coli* M-17, известного наличием *pks* острова, помимо *Iyu* и *MliC* установлен неспецифический ингибитор лизоцима – *EspP* с последовательностью WP_001034100.1, кодирующей полипептид длиной 1300 аминокислотных остатков. У штаммов *K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA, носителей двух исследуемых детерминант – колибактина и аэробактина, в геноме были обнаружены как *Iyu*, *MliC*, так и *PliC* – переплазматический ингибитор лизоцима С-типа, а также *LprI*, который несет в себе лизоцим-связывающий мотив мембранно-связанных ингибиторов лизоцима семейства белков лизоцима С-типа (*MliC*), принадлежащих к классу ингибиторов лизоцима.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время способность бактерий извлекать железо рассматривается в качестве одного из универсальных свойств, необходимых для жизнедеятельности прокариот как в окружающей среде, так и в организме человека. Большинство исследований в этой области посвящены изучению молекулярно-генетической основы процессов синтеза сидерофоров, их поглощения и регуляции в бактериальной клетке (Wami et al., 2021; Bosveli et al., 2023). Накоплены данные о классах структурно различных молекул сидерофоров энтеробактерий, которые представляют собой вторичные метаболиты, извлекающие микроэлементы из окружающей среды и доставляющие их в клетки через специфические рецепторы (Kramer et al., 2020).

Учитывая, что хелатирующие вещества — это гораздо больше, чем просто переносчики железа, показано, что они являются важными медиаторами взаимодействий между микробным сообществом и организмом хозяина (Кузнецова и соавт., 2022), и актуальным является изучение экологических и эволюционных аспектов секреции бактериями хелатирующих факторов, а именно их значение в формировании патогенного и персистентного потенциала энтеробактерий. Наличие связи секреции сидерофоров с вирулентностью бактерий определило внимание исследователей к пониманию биохимических и молекулярных механизмов поглощения железа патогенами в условиях инфекции (Kramer et al., 2020; Кузнецова и соавт., 2022). Вместе с тем научный интерес представляет изучение данных факторов среди условно-патогенных микроорганизмов, колонизирующих слизистые организма человека и являющихся симбионтными бактериями хозяина, к которым относятся представители семейства *Enterobacteriaceae*.

Проведенная работа позволила с использованием сконструированных праймеров и разработанного единого алгоритма мультиплекс-ПЦР установить среди кишечных изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae* наличие широкой частоты встречаемости штаммов носителей генетических детерминант *clbBN* и *iucBC*, кодирующих синтез аэробактина и колибактина. Анализ результатов секвенирования геномов типовых культур *E. coli* M-17 и *E. coli* LEGM-18, *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и ICIS-277_SVA, *K. pneumoniae* MGH 78578, отличающихся по наличию исследуемых детерминант, подтвердил, что использование оригинальных праймеров позволяет выявлять штаммы-носители генов биосинтеза и транспорта колибактина и аэробактина.

Наличие в геноме у энтеробактерий детерминант синтеза хелатирующих факторов соотносилось с фенотипической способностью штаммов продуцировать железосвязывающие соединения, где наибольшую активность проявляли штаммы-носители обоих генов *clbBN* и *iucBC*. Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе штаммов энтеробактерий, способных к синтезу аэробактина, колибактина и, следовательно, утилизации железа, при адаптации к конкурентной среде кишечного биотопа хозяина. Кроме того, эти данные позволяют сделать вывод о широкой распространенности в популяции условно-патогенных энтеробактерий экологических типов штаммов с патогенным и персистентным потенциалом, которые могут вызывать заболевания как кишечной, так и внекишечной локализации.

Известно, что аэробактин вносит вклад во внеклеточный патогенез штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, в связи с чем аэробактин относят к факторам вирулентности (Chen et al., 2021).

Синтез колибактина, хелатора железа, обеспечивается кластером геномного острова патогенности — *pks* (Бондаренко, Фиалкина, 2012; Bosveli et al., 2023), первичными краевыми маркерами которого являются гены *clbB* и *clbN*. Наибольшая активность в отношении продукции железосвязывающих соединений, которую продемонстрировали штаммы с двумя детерминантами, может определяться и наличием в структуре *pks* фосфопантетеинилтрансферазы (PPTase) *clbA*, которая также способствует производству сидерофора иерсиниабактина (Wami et al., 2021).

Кроме того, следует отметить и способность персистентных свойств микроорганизмов “маркировать” экологическую принадлежность бактерий (Бухарин, 1999). Было установлено, что культуры условно-патогенных энтеробактерий с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC* обладали достоверно более высокими значениями антилизоцимной, антикарнозиновой, антипептидной активности в отношении ФНО α , антииммуноглобулиновой активности в отношении IgM/IgG и биопленкообразования, что свидетельствует об их выраженных персистентных свойствах, которые могут рассматриваться как малые факторы патогенности. Вместе с тем персистентный потенциал бактерий позволяет микроорганизмам противостоять защитным факторам хозяина, что обеспечивает их выживание и адаптацию в организме хозяина, а также распространение энтеробактерий в природных эконисах (Бухарин и соавт., 2006).

Учитывая связь генетических детерминант ингибиторов лизоцима с фенотипическим проявлением антилизоцимной активности, являющейся частью общего механизма лизоцимрезистентности бактерий (Бухарин и соавт., 2006), выявление широкого набора генов секретируемых ингибиторов лизоцима у штаммов *clbBN⁺iucBC⁺* может соотноситься с их высоким уровнем персистентных свойств. Так, в геномах всех исследуемых типовых и кишечных штаммов энтеробактерий установлено наличие известных гомологов детерминант ингибиторов лизоцима *Iyu* и *MliC*, а штаммы *clbBN⁺iucBC⁺* в геноме содержали дополнительно неспецифический ингибитор лизоцима — *EspP* (*E. coli* M-17) и *PliC* — периплазматический ингибитор лизоцима C-типа и *LprI* (*K. pneumoniae* ICIS-278_PBV и *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA).

Таким образом, рассмотрение взаимоотношения факторов персистенции и способности культур *E. coli* и *K. pneumoniae* секретировать железосвязывающие соединения на гено- и фенотипическом уровнях позволило получить новые данные о широкой частоте встречаемости в популяции условно-патогенных энтеробактерий экологических типов штаммов с патогенным и персистентным потенциалом. Показано, что штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC*

характеризуются наличием генотипических и фенотипических признаков сидерофоропродукции, протеазной активности в отношении антимикробных факторов хозяина, что позволяет их использовать в качестве маркеров патогенного и персистентного потенциала условно-патогенных энтеробактерий. Конструирование праймеров и разработка единого алгоритма мультиплекс-ПЦР для выявления экологических патотипов штаммов в популяции энтеробактерий кишечника человека определило практическое значение данных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят к.м.н. А.О. Плотникова и д.т.н. Ю.А. Хлопко за техническую помощь в подготовке библиотеки ДНК и секвенировании генов штаммов энтеробактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ИКВС УрО РАН “Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине” № FUUG-2022-0007.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондаренко В.М., Фялкина С.В. Наличие генов генотоксина, ассоциированных с *pks* островом патогенности, у пробиотического штамма *Escherichia coli* М-17 // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 5. С. 25–27.
- Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 365с.
- Бухарин О.В., Вальшев А.В., Гильмутдинова Ф.Г. Экология микроорганизмов человека / Отв. ред. Бухарин О.В. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 480 с.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина. 2005. 367 с.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Здвижкова И.А., Перунова Н.Б. Анализ антибиотикорезистентности клинических изолятов *Escherichia coli* с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC* // Клиническая лабораторная диагностика. 2023. Т. 68. С. 489–495.
- Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Смолягин А.И. Антицитокиновая активность микроорганизмов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 4. С. 56–61.
- Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Этиологическая значимость условно патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1. № 2. С. 181–184.
- Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. Санкт-Петербургский гос. ун-т. 2007. 341 с.
- Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчиков О.Н. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 3. С. 14–22.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 159 с.
- Новикова И.А. Железо и иммунный ответ (лекция) // Проблемы здоровья и экологии. 2011. № 4. С. 42–48.
- Bosveli A., Griboura N., Kampouropoulos I., Kalaitzakis D. The rapid synthesis of colibactin warhead model compounds using new metal-free photocatalytic cyclopropanation reactions facilitates the investigation of biological mechanisms // Chem. Eur. J. 2023. V. 29. Art. e202301713.
<https://doi.org/10.1002/chem.202301713>
- Chen X., Wenxing L., Huoming L., Shigan Y., Jiang F., Cai W., Li G. Whole genome sequencing analysis of avian pathogenic *Escherichia coli* from China // Vet. Microbiol. 2021. V. 259. Art. 109158.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109158>
- Garcie C., Tronnet S., Garénaux A., McCarthy A.J., Brachmann A.O., Pénary M., Houle S., Nougayrède J.P., Piel J., Taylor P.W., Dozois C.M., Genevaux P., Oswald E., Martin P. The bacterial stress-responsive Hsp90 chaperone (HtpG) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli* // J. Infect. Dis. 2016. V. 214. P. 916–924.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw294>
- Jeong G., Khan F., Khan S., Nazia Tabassum N., Sonu Mehta S., Kim Y. *Pseudomonas aeruginosa* virulence attenuation by inhibiting siderophore functions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2023. V. 4. P. 1019–1038.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12347-6>
- Himpl S.D., Mobley H.L.T. Siderophore detection using chrome azurol S and cross-feeding assays // Meth. Mol. Biol. 2019. P. 97–108.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9601-8_10
- Kirienko D.R., Kang Donghoon, Kirienko N.V. Novel pyoverdine inhibitors mitigate *Pseudomonas*

- aeruginosa* pathogenesis // Front. Microbiol. 2019. V. 9. Art. 3317.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03317>
- Kramer J., Özkaya Ö., Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. P. 152–163.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Lages M.A., Balado M., Lemos M.L. The expression of virulence factors in *Vibrio anguillarum* is dually regulated by iron levels and temperature // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 2335.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02335>
- Martin P., Marcq I., Magistro G., Penary M., Garcie C., Payros D., Boury M., Olier M., Nougayrède J.P., Audebert M., Chalut C., Schubert S., Oswald E. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli* // PLoS Pathog. 2013. V. 9. Art. e1003437.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437>
- Müller L., Müller D., Sandrine Kammerecker S., Fluri M., Neutsch L., Emsermann M., Pelludat C. Effects in the apple flower determine if the siderophore desferrioxamine is a virulence factor for *Erwinia amylovora* CFBP1430 // Appl. Environ. Microbiol. 2022. V. 88. Art. e02433-21.
<https://doi.org/10.1128/aem.02433-21>
- O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B., Kolter R. Genetic approaches to study of biofilms // Meth. Enzymol. 1999. V. 310. P. 91–109.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)10008-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)10008-9)
- Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // Anal. Biochem. 1987. V. 1. P. 47–56.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Searle L.J., Méric G., Porcelli I., Sheppard K.S., Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli* // PLoS One. 2015. V. 10. Art. e0117906.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117906>
- Ullah I., Lang M. Key players in the regulation of iron homeostasis at the host-pathogen interface // Front. Immunol. 2023. V. 14. Art. 1279826.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1279826>
- Wami H., Wallenstein A., Sauer D., Stoll M., Büna R., Oswald E., Müller R., Dobrindt U. Insights into evolution and coexistence of the colibactin- and yersiniabactin secondary metabolite determinants in enterobacterial populations // Microb. Genomics. 2021. V. 7. Art. 000577.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000577>

Persistent Profile of *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* Strains with Genetic Determinants of Iron Chelaters

O. V. Bukharin*, E. V. Ivanova, I. A. Zdvizhkova, N. B. Perunova

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences 460014, Orenburg, Russia

*e-mail: walerewna13@gmail.com

Abstract. The objective of this study is to characterize the relationship between the persistent profile and the ability to produce iron-binding compounds of intestinal isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* with the genetic determinants *iucBC* and *clbBN*, both at the phenotypic and genetic levels. The use of designed primers and a developed unified multiplex-PCR algorithm permitted the establishment of a wide frequency of occurrence (44.0–80.0%) among opportunistic strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* cultures with genetic determinants *clbBN* and *iucBC*, which encode the synthesis of aerobactin and colibactin. The presence of the *clbBN/iucBC* genes in the genetic apparatus of enterobacteria was found to result in a pronounced ability to produce iron-binding compounds and a wide range of persistent characteristics (antilysozyme, anticarnosine, antipeptide activity with respect to TNF α , antiimmunoglobulin activity with respect to IgM/IgG and biofilm formation). A comparison of the genomes of sequenced *clbBN⁺iucBC⁺* strains with those of *clbBN⁻iucBC⁻* strains revealed the presence of genes essential for the biosynthesis and transport of aerobactin, a comprehensive list of pks island genes, and the existence of known homologues of the lysozyme inhibitor determinants Ivy and MliC, *EspP* (*E. coli* M-17) and *PliC*, *LprI* (*K. pneumoniae* ICIS-278_PBV and *K. pneumoniae* ICIS-277_SVA) were identified. Therefore, strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* that possess the genetic determinants of iron chelators, namely *clbBN* and *iucBC*, exhibit both genotypic and phenotypic indications of siderophore production and protease activity against host antimicrobial factors. This allows for the use of these strains as markers of the pathogenic and persistent potential of opportunistic enterobacteria.

Keywords: opportunistic enterobacteria, genetic determinants of colibactin and aerobactin, persistent and pathogenic potential