

Курильщикова Александр Михайлович

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ *IXODES  
PERSULCATUS, IXODES PAVLOVSKYI, DERMACENTOR RETICULATUS***

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

д.б.н., доцент **Тикунова Нина Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

**Локтев Валерий Борисович**, д.б.н., профессор  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор, заведующий отделом

**Ромашенко Александр Викторович**, к.б.н.  
Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и  
генетики СО РАН, младший научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Защита состоится «29» января 2016 года в 12:00 часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, пр. Ак.  
Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «25» декабря 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
к.х.н., доцент

Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Клещи, входящие в семейство Ixodidae, являются переносчиками широкого спектра инфекционных агентов (Dantas-Torres, 2012; Neuman et al, 2010). На территории Западной Сибири клещи *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930 являются основными переносчиками вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), а также большого числа патогенных бактерий: *Borrelia burgdorferi* sensu lato и *Borrelia miyamotoi*, «*Candidatus* Rickettsia tarasevichiae», *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae* (Fomenko et al, 2008; Mikryukova et al, 2014; Rar et al, 2015). В ряде регионов на юге Западной Сибири обитают клещи *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev, 1946 (Филиппова, 1977). Этот вид также переносит возбудителей Лайм-боррелиоза, гранулоцитарного эрлихиоза, моноцитарного анаплазмоза и ВКЭ (Чаусов et al, 2009; Korenberg et al, 2010; Igolkina et al, 2015). С начала этого века клещи *I. pavlovskyi* стали часто выявляться в зеленой зоне Новосибирска и Томска, расположенных севернее их традиционного места обитания, на равнине Западной Сибири, и в настоящее время клещи *I. pavlovskyi* на этих участках преобладают над клещами *I. persulcatus* (Ливанова с соавт., 2011; Романенко, 2005; Romanenko, Leonovich, 2015). На территории Западной Сибири еще один вид клещей из семейства Ixodidae – *Dermacentor reticulatus*, вовлечен в передачу ряда этиологических агентов заболеваний человека и животных – вируса омской геморрагической лихорадки, *B. burgdorferi* s. l., *Rickettsia raoultii*, *Bartonella quintana* и *Babesia canis* (Rar et al 2005). Кроме вышеперечисленных видов клещей в поддержании природных очагов инфекций, передаваемых клещами, могут быть вовлечены и другие виды семейства Ixodidae – *Ixodes trianguliceps*, *Dermacentor nuttali*, *Haemaphysalis concinna* и др. (Igolkina et al, 2015; Svehlova et al, 2014).

Среди уже известных инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами, на территории России первое место по количеству случаев заболевания занимает иксодовый клещевой боррелиоз, вызываемый бактериями рода *Borrelia* комплекса *B. burgdorferi* s. l. (Rar et al, 2005a). Циркулирующие на территории Западной Сибири боррелии могут отличаться от штаммов, циркулирующих на территории других стран. Полногеномные исследования *Borrelia* spp, характерных для территории России, могли бы прояснить этот вопрос, однако подобных исследований ранее не проводилось.

В последние годы ведется активная работа по выявлению возбудителей ряда относительно редких инфекций, переносимых иксодовыми клещами на территории Сибири (Fomenko et al, 2010; Rar et al, 2011; Tkachev et al, 2014). Вместе с тем, полагают, что спектр патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, переносимых клещами, значительно шире, и его изучение требует не только применения классических молекулярно-генетических методов анализа, но и методов геномного и метагеномного анализа (Carpí et al, 2011). Метагеномных исследований микробиомов клещей, эпидемически значимых на территории Западной Сибири, ранее не проводилось.

Поскольку клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* and *D. reticulatus* часто встречаются в Западной Сибири в зеленых зонах больших городов, на сельскохозяйственных территориях и в местах, активно посещаемых туристами, необходимо в первую очередь исследовать разнообразие возбудителей инфекционных заболеваний, ассоциированных с этими видами клещей.

**Цель настоящей работы** – исследование бактериальных сообществ, ассоциированных с иксодовыми клещами – переносчиками эпидемически значимых на территории Западной Сибири инфекций, и геномики боррелий, выявляемых в этих клещах.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- 1) исследовать таксономическую структуру микробиомов клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy*, *D. reticulatus* методом параллельного секвенирования фрагментов генов 16S рибосомальной РНК;
- 2) провести сравнительный анализ микробиомов, ассоциированных с различными видами и полами изучаемых клещей;
- 3) определить полногеномные последовательности бактерий комплекса *B. burgdorferi* s. l., изолированных на территории Западной Сибири, и выполнить аннотацию полученных геномных последовательностей;
- 4) провести сравнительный анализ секвенированных геномных последовательностей изолятов боррелий.

**Научная новизна исследований.** В рамках настоящей работы впервые: была установлена структура микробиомов клещей *I. pavlovskiy*, *D. reticulatus*; определена относительная представленность различных таксонов бактерий в структуре изученных микробиомов; выявлена зависимость микробиома от пола у клещей рода *Ixodes*; доказано наличие статистически достоверных различий биоразнообразия и таксономической структуры микробиомов, ассоциированных с различными видами и полами клещей; обнаружены последовательности *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* и *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. pavlovskiy* и *Ehrlichia spp.* в клещах *D. reticulatus*; проведено секвенирование и анализ полных геномов бактерий *Borrelia bavariensis*, *Borrelia afzelii* и *Borrelia valaisiana*, выделенных из клещей вида *I. persulcatus*. К настоящему времени эти последовательности являются единственными доступными полногеномными последовательностями боррелий, циркулирующих на территории Российской Федерации.

**Практическая значимость работы.** Обнаружение новых инфекционных агентов в клещах *I. pavlovskiy* и *D. reticulatus* свидетельствует о большем эпидемическом потенциале этих видов переносчиков. Предложенный метод анализа микробиомов пулов клещей может быть использован для быстрой оценки эпидемического потенциала природных очагов инфекций, переносимых клещами. Полученные геномные последовательности и последовательности плазмид возбудителей Лайм-боррелиоза, циркулирующих на территории Западной Сибири, доступны в базе данных GenBank и могут быть использованы для разработки новых диагностикумов и оптимизации уже существующих.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту.**

В микробиомах клещей *I. persulcatus* обнаружен 81 род бактерий, клещей *I. pavlovskyi* - 115 родов, клещей *D. reticulatus* - 61 род.

Структура микробиомов самцов и самок клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* значительно различается.

Уровень биоразнообразия у клещей *I. pavlovskyi* достоверно выше, чем у клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus*.

В клещах *I. pavlovskyi* обнаружены последовательности бактерий *A. phagocytophilum* и *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. В клещах *D. reticulatus* присутствуют последовательности *Ehrlichia* spp.

Реконструированы и аннотированы последовательности мастер-хромосом и плазмид бактерий *B. afzelii*, *B. bavariensis* и *B. valaisiana*, выделенных из клещей *I. persulcatus*.

Геномы реконструированных штаммов боррелий отличаются от геномных последовательностей боррелий, выделенных из других видов иксодовых клещей, приблизительно на 1%.

**Публикация и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 3 зарубежных статьи, индексируемых в базах данных Scopus и PubMed, и 2 российских статьи в журнале, рекомендованном ВАК. Результаты работы были представлены на российской и зарубежных конференциях: Научная конференция “Фундаментальные науки – медицине”, Новосибирск, 2013; XII International Jena Symposium on Tickborne Diseases (IJSTD – XII), Веймар, 2013; German Symposium for Zoonoses Research, Берлин, 2014; 14th international conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases, Вена, Австрия, 2015.

**Вклад автора.** Выделение ДНК из пулов клещей, анализ данных 16S профилирования (склеивание парных тегов, фильтрация по качеству, кластеризация ридов, таксономический биннинг, регрессионный анализ, анализ главных компонент и главных координат и другие статистические методы анализа) был выполнен автором лично. Анализ данных полногеномного секвенирования боррелий, включающий этапы препроцессинга и фильтрации данных, сборку геномных контигов *de novo*, скаффолдинг, разрешение повторов и аннотацию геномов, также был выполнен автором лично. Сбор клещей для исследования проводили к.б.н. Н.Н. Ливанова, к.б.н. С. Г. Ливанов (ИСиЭЖ СО РАН) и к.м.н. О. В. Стронин (ФГУП «НПО Микроген» Минздрава РФ, филиал «НПО Вирион» в г. Томске), культивирование боррелий было выполнено к.м.н. О. В. Строниним. Выделение ДНК из культур клеток боррелий проводили к.б.н. Н. В. Фоменко, к.б.н. Е. В. Бреннер. Подготовка библиотек для секвенирования и непосредственно секвенирование было выполнено коллективом ЦКП “Геномика” СО РАН.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения работы, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 20 рисунков и 9 таблиц. Список литературы состоит из 230 ссылок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. 16S-профилирование микробиомов клещей

#### 1.1. Сбор клещей для метагеномного исследования

Сбор клещей для проведения метагеномного анализа был проведен на территории Новосибирской области флаговым методом. Клещи всех видов были собраны в сезон максимальной активности: май-июнь. Клещи вида *I. persulcatus* собраны в Тогучинском районе (координаты точки сбора N55°01'07", E84°06'41"), клещей *I. pavlovskyi* собирали на территории Новосибирского Научного центра (N54°29'54,6" E83°05'57,7"), клещи *D. reticulatus* были собраны в районе Нижней Ельцовки г. Новосибирска (N54°53'15", E83°08'45").

Общее количество отобранных для исследования клещей составило 1214 шт. Таксономическую принадлежность клещей определяли с помощью секвенирования фрагментов гена цитохром оксидазы и межгенного спейсера 2, и последующей идентификацией фрагмента с помощью глобального выравнивания. Коллекция клещей была охарактеризована по видовому и половому составу, после чего клещи были объединены в группы по 5 самок или 7 самцов одного вида. Перед выделением ДНК клещи хранились на -70 °С. Из каждого образца ДНК от 5 самок или 7 самцов равные аликвоты были объединены с образованием 12 библиотек ДНК: PersM1, PersM2, PersF3, PersF4, PavlM5, PavlM6, PavlF7, PavlF8, DermM9, DermM10, DermF11, DermF12 (по два репликата для каждой группы «один вид – один пол»).

#### 1.2. Характеризация библиотек и оценка биоразнообразия микробиомов

Фрагмент гена 16S рРНК, использованный для филотипирования, включал гипервариабельные домены V3-V5, с подбором максимально универсальных праймеров. Домен V3 позволяет эффективно классифицировать бактерии до уровня рода (Chakravorty et al, 2007, Wang et al, 2009). Длина ампликона, доступная для секвенирования на используемой платформе Illumina Miseq, позволила включить также домены V4 и V5. Всего было секвенировано 12 пулированных образцов. Количество ридов для библиотек составило от 6152 до 23477 ридов.

Для предотвращения инфляции биоразнообразия, вызванной ошибками секвенирования и присутствием ПЦР-химер (амплифицированных фрагментов, содержащих участки двух и более ДНК-матриц), все OTU, обнаруженные однократно во всех библиотеках, были удалены перед анализом биоразнообразия. Всего было обнаружено 28569 OTU, из которых 2802 присутствовали в количестве 2 и более копий, а 25767 являлись синглтонами – OTU, зарегистрированными однократно. Последовательности ДНК из 726 OTU были обнаружены в клещах *I. persulcatus* (520 у самцов и 390 у самок); 2306 OTU в *I. pavlovskyi* клещей (1709 у самцов, 1316 у самок); 654 OTU в клещах *D. reticulatus* (474 у самцов, 437 у самок). Оценки количества OTU, присутствующих в образцах, полученные методами chao и бутстреп, приведены в таблице 1. Для проведения сравнительного анализа библиотеки были рарифицированы до объема минимальной библиотеки. Для библиотек было оценено альфа- и бета-разнообразие. Альфа-разнообразие было оценено с помощью индекса энтропии Шэннона (H). Бета-разнообразие было

оценено как отношение альфа-разнообразия к гамма-разнообразию.

Было обнаружено, что бактериальные сообщества *I. pavlovskiyi* обладали наибольшим биоразнообразием:  $2058 \pm 232$  OTU и  $3,86 \pm 0,73$  H. Микробиомы клещей *D. reticulatus* и *I. persulcatus* были менее разнообразны:  $637 \pm 65$  OTU

**Таблица 1** - Оценка параметров биоразнообразия в исследуемых образцах

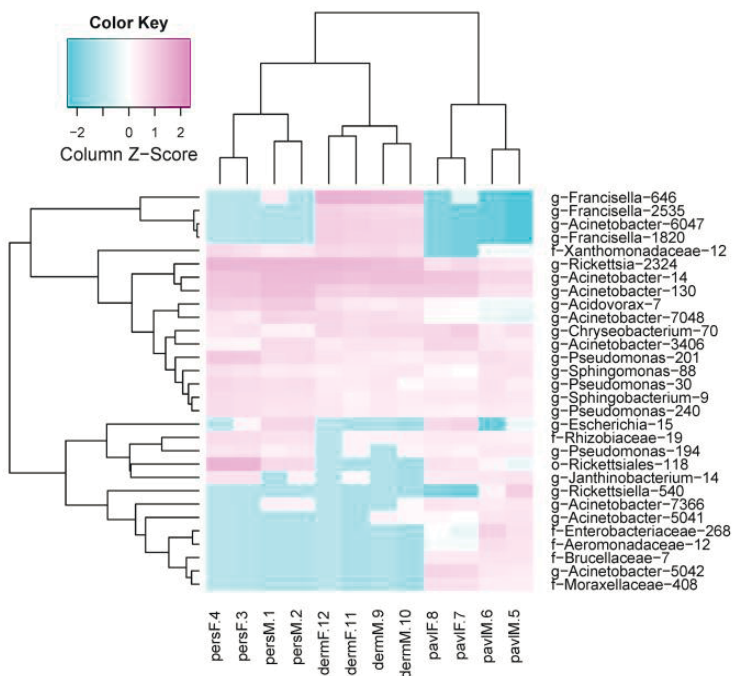
Вид клещей	<i>I. persulcatus</i>		<i>I. pavlovskiyi</i>		<i>D. reticulatus</i>	
Пол клещей	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Количество OTU	520	390	1709	1316	474	437
<b>Виды клещей</b>						
Вид клещей	<i>I. persulcatus</i>		<i>I. pavlovskiyi</i>		<i>D. reticulatus</i>	
Количество OTU	726		2306		654	
Количество OTU после удаления синглтонов	638		1693		532	
Chao	973 $\pm$ 46		2749 $\pm$ 89		849 $\pm$ 50	
Bootstrap	773 $\pm$ 98		2058 $\pm$ 232		637 $\pm$ 65	
Индекс Шэннона (H)	2,06 $\pm$ 0,27		3,86 $\pm$ 0,73		2,01 $\pm$ 0,23	
Бета разнообразие	1,56		1,59		1,28	

( $H = 2,01 \pm 0,23$ ) для *D. reticulatus* и  $773 \pm 98$  OTU ( $H = 2,06 \pm 0,27$ ) для *I. persulcatus*. Статистический тест Тьюки подтвердил, что биоразнообразие микробиомов клещей *I. pavlovskiyi* достоверно превышает биоразнообразие клещей *I. persulcatus* ( $p = 0,0014$ ) и *D. reticulatus* ( $p = 0,0011$ ), в то время как между *I. persulcatus* и *D. reticulatus* достоверной разницы нет ( $p = 0,9888$ ).

### 1.3. Кластеризация микробиомов и выявление эффектов вида и пола клеща

Для оценки межгрупповых различий в структурах микробиомов клещей были использованы методы иерархической кластеризации и пермутационные дисперсионные тесты на основе матрицы дистанций в качестве зависимой переменной. На рисунке 1 приведена тепловая карта, построенная на основе 30 наиболее часто встречаемых OTU. Иерархическое древо, построенное на основе евклидовых дистанций по пространству координат данных 30 OTU, приведено в верхней части рисунка; на нем видно строгое разделение образцов в соответствии с видом и полом клещей, что свидетельствует о наличии видо- и полоспецифической структуры в изучаемых микробиомах. Для оценки статистической значимости различий на полной структуре данных, включающей все OTU, был проведен статистический тест adonis (analysis of variance using distance matrices) из пакета vegan (Таблица 2). В качестве зависимой переменной была использована матрица дистанций, посчитанная с использованием индекса различий Брея-Кертиса, ввиду его большей применимости к экологическим (и, в частности, микробиологическим)

данным по сравнению с большинством других методов подсчета дистанций. В применении к общей матрице дистанций, переменная “вид” описывает около 55% суммарной дисперсии и является статистически значимой ( $p < 10^{-4}$ ). Переменная “пол” описывает около 10% вариации и также является статистически значимой ( $p < 5 \times 10^{-2}$ ). Однако присутствие межполовых различий в структуре микробиома варьирует в зависимости от вида клещей. Для клещей *I. persulcatus* пол описывает 85% внутривидовой вариации, для *I. pavlovskiyi* – 67% внутривидовой вариации, для *D. reticulatus* – 57%.



**Рисунок 1** - Тепловая карта и иерархическая кластеризация образцов и OTU, построенная для 30 наиболее представленных OTU. В названии OTU (список справа) указан таксон, которому принадлежит OTU, и уникальный номер-идентификатор OTU

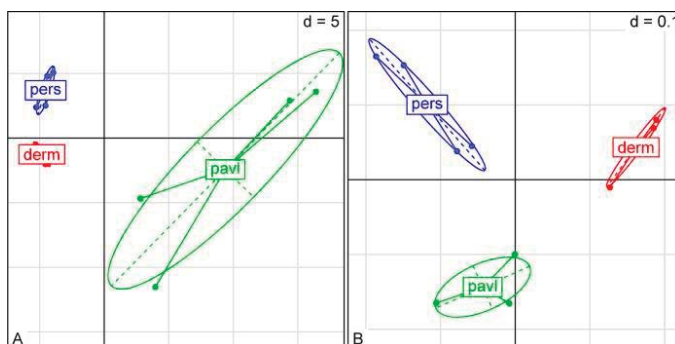
С учетом малого количества степеней свободы при вычислении p-value, значимые межполовые различия были показаны только для клещей рода *Ixodes*, в то время как для *D. reticulatus* межполовые различия были показаны как недостоверные (Таблица 2). Таким образом, структура микробиома клещей *D. reticulatus* наиболее гомогенна среди трех исследованных видов клещей, и демонстрирует наименьшую обусловленную полом гетерогенность. Для визуализации сравнения структуры микробиомов к данным были применены методы ротации – метод главных компонент на основе евклидовых дистанций и метод главных координат с использованием расстояния UniFRAC. Плот первых двух компонент приведен на рисунках 2А и 2Б.



Первые два компонента дисперсии описывают более 70% суммарной дисперсии при использовании метрики UniFRAC как метода оценки дистанций между образцами. При этом однозначно видна значительная дисперсия в образцах клещей *I. pavlovskyi* относительно других видов клещей.

**Таблица 2** - Результаты статистического анализа adonis для переменных “вид” и “пол” клещей с матрицей дистанций Брея-Кертиса, построенной на основе таблиц OTU, в качестве зависимой переменной.

Переменная	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Все виды клещей						
пол	1	0,31787	0,31787	2,3759	0,10490	0,0322
вид	2	1,64208	0,82104	6,1368	0,54189	9,999e-05
Res.	8	1.07031	0.13379		0.3531	
<i>I. persulcatus</i>						
Пол	1	0,37968	0,37968	11,841	0,8555	0,04167
Res.	2	0,06413	0,03207		0,1445	
<i>I. pavlovskyi</i>						
Пол	1	0,47345	0,47345	4,0852	0,67133	0,04167
Res.	2	0,23179	0,11589		0,3287	
<i>D. reticulatus</i>						
Пол	1	0,13803	0,138025	2,7301	0,57718	0,3333
Res.	2	0,10111	0,050556		0,4228	



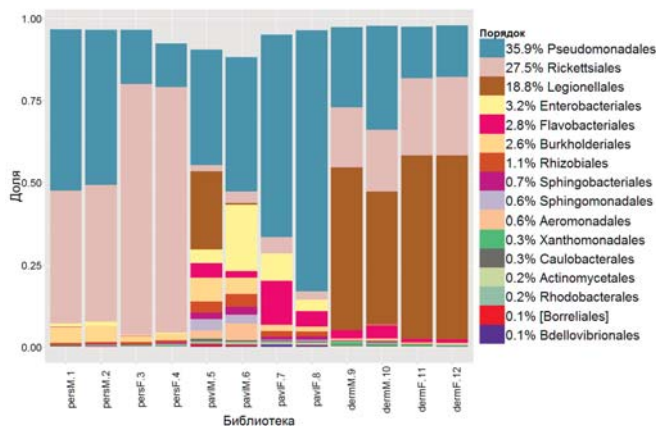
**Рисунок 2** - Визуализация метода главных координат на основе различных матриц дистанций. А) график первых двух компонент, полученных с помощью метода главных компонент (PCA) на основе евклидовых дистанций с центрированием и нормированием переменных. Б) график первых двух компонент метода главных координат (PCoA) с использованием метрики UniFRAC

#### 1.4. Характеризация таксономической структуры микробиомов клещей

После кластеризации секвенированных последовательностей с формированием таблицы OTU, для каждой OTU была выбрана центроидная последовательность, для которой был проведен таксономический биннинг. Биннинг был проведен с помощью пакета RDP classifier с пороговым значением сходства, равным 0,80. Во всех образцах, за исключением образцов самцов клещей *I. pavlovskyi*, на уровне типа более 95% микробиома представлено бактериями из типа Proteobacteria.

На таксономическом уровне класса доминирующими таксонами среди всех образцов были представители классов Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria, с удельной встречаемостью 30,2% и 60,8% соответственно.

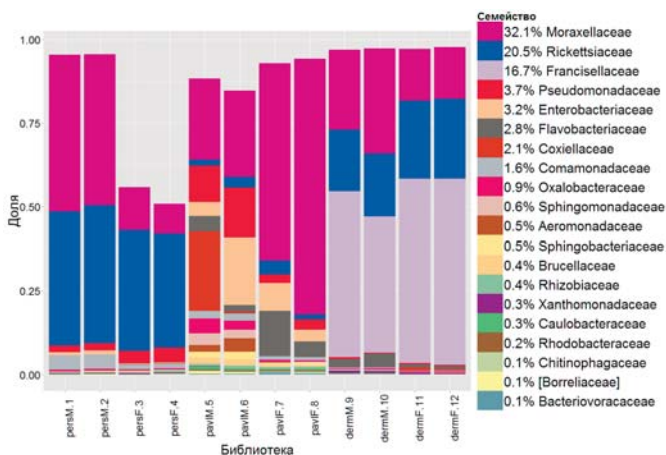
На уровне порядка, наибольшая средняя встречаемость была выявлена для Pseudomonadales (35,9%), Rickettsiales (27,6%) и Legionellales (18,8%) (Рисунок 3).



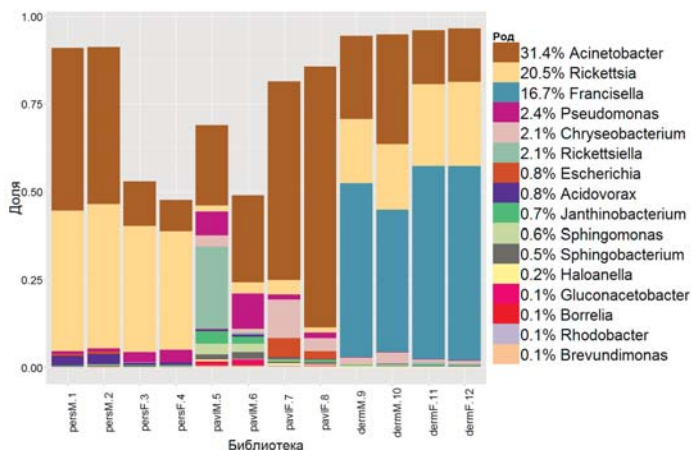
**Рисунок 3** – Представленность порядков бактерий в исследуемых образцах. Пороговое значение средней встречаемости таксона для отображения: 0,1%

На уровне семейства, наибольшая средняя встречаемость была выявлена для семейств Moraxellaceae, Rickettsiaceae, Francisellaceae (Рисунок 4). Доля последовательностей, принадлежащих семейству Moraxellaceae, составила в среднем 32,1% (диапазон – от 8,9% в образце самок *I. persulcatus* до 76,3% в одном из образцов самцов *I. pavlovskyi*). Доля семейства Rickettsiaceae составила 20,5%, причем в зависимости от вида клещей представленность варьировала от 1,5% у клещей *I. pavlovskyi* до 21,1% у клещей *D. reticulatus* и 41,1% у *I. persulcatus*. Представители семейства Francisellaceae практически отсутствовали у представителей рода *Ixodes*, в то время как у клещей *D. reticulatus* доля бактерий семейства Francisellaceae составляла от 40,5% до 55,4%. Средняя встречаемость представителей этого семейства составила 16,7%.

На уровне рода, наибольшую долю в структуре исследованных микробиомов составили представители рода *Acinetobacter* (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Moraxellaceae) и *Rickettsia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae) (Рис. 5).



**Рисунок 4** – Представленность семейств бактерий в исследуемых образцах. Пороговое значение средней встречаемости таксона для отображения: 0,1%.



**Рисунок 5** – Столбчатая диаграмма представленности родов бактерий в исследуемых образцах. Пороговое значение средней встречаемости таксона для отображения: 0,1%

Представленность этих родов значительно варьировала в зависимости от пола и вида клещей. Бактерии рода *Acinetobacter* в наибольшем количестве были обнаружены у самок *I. pavlovskyi* (65.4%) и самцов *I. persulcatus* (45.6%); в остальных группах представленность ацинетобактерий варьировала от 8.8 to 31.3%. Помимо рода *Acinetobacter*, другие представители порядка Pseudomonadales семейств Moraxellaceae и Pseudomonadaceae также были обнаружены во всех

исследованных образцах. Доля бактерий рода *Rickettsia* в структуре исследованных микробиомов была значительной у клещей вида *I. persulcatus* (41% у самцов и 35% у самок) и *D. reticulatus* (18.5% у самцов, 23.7% у самок), в то время как у клещей вида *I. pavlovskiyi* она была значительно ниже и составила от 2.5% до 3.8% у самцов и самок, соответственно. Кроме того, выбранный для амплификации фрагмент гена 16S рПНК, позволил разделить последовательности ДНК, принадлежащие виду *Rickettsia*, и кандидатному виду *Rickettsiales bacterium "Montezuma"*. Доля последнего была достаточно высока в структуре микробиома самок *I. persulcatus* (~40%), в то время как у самцов клещей этого вида, как и в образцах других видов клещей, доля этой бактерии не превысила одного процента.

Бактерии рода *Francisella* были обнаружены в значительных количествах в образцах клещей *D. reticulatus*, составляя до половины микробиома клещей этого вида. В образцах клещей рода *Ixodes* францизеллы либо отсутствовали, либо присутствовали в незначительных количествах. Помимо представителей рода *Francisella*, в образцах клещей *D. reticulatus* были также обнаружены представители семейства *Francisellaceae*, группы *Francisella-like endosymbionts*, чья таксономическая принадлежность на уровне вида и рода в настоящее время неясна. Разделить патогенные и непатогенные для человека виды францизелл среди обнаруженных в исследовании последовательностей представляется невозможным ввиду недостаточной вариабельности выбранного участка гена 16S рПНК.

В образцах клещей рода *Ixodes* как вида *I. persulcatus*, так и *I. pavlovskiyi* были обнаружены последовательности ДНК, принадлежащие бактериям рода *Borrelia* (*Spirochaetes*, *Spirochaetales*, *Spirochaetaceae*). Регион гена 16S рПНК, выбранный для амплификации, позволил идентифицировать как боррелии комплекса *B. burgdorferi* s. l., так и боррелии комплекса ВКЛ. В образцах клещей *D. reticulatus* последовательностей ДНК боррелий обнаружено не было.

Ряд образцов содержал последовательности ДНК, принадлежащие бактериям семейства *Anaplasmataceae*, некоторые представители которого являются возбудителями заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. В пулированных образцах клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus* были обнаружены последовательности ДНК бактерий рода *Ehrlichia*, имеющие наибольшую гомологию с видом *E. muris*. Образцы клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi* содержали последовательности ДНК анаплазм. Кроме того, в образце самцов клещей *I. pavlovskiyi* были обнаружены последовательности, принадлежащие бактерии *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.

Все исследованные образцы содержали незначительные количества фрагментов ДНК, принадлежащие видам *Pseudomonas* spp., *Chryseobacterium* spp., *Acidovorax* spp., *Janthinobacterium* spp., *Sphingobacterium* spp и другим видам свободноживущих бактерий-сапрофитов. Предположительно, эти бактерии могут населять экзоскелет клещей. Также были обнаружены фрагменты ДНК бактерий *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Bifidobacterium* spp., *Yersinia* spp. и других бактерий – симбионтов человека и животных.

В одном из образцов самцов клещей *I. pavlovskyi* была обнаружена значительная (более 20%) доля бактерий рода *Rickettsiella*. В других исследованных образцах доля бактерий этого вида не превышала одного процента, а в образцах клещей *I. persulcatus* эта бактерия не была обнаружена.

#### **1.5. Обсуждение результатов 16S-профилирования микробиомов клещей**

Симбиотические бактериальные сообщества, ассоциированные с клещами, включают бактерии, необходимые для нормального функционирования организма клещей, микроорганизмы, патогенные (нежелательные) для клещей, и бактерии, переносимые клещами позвоночным хозяевам, чья патогенность для клещей, как правило, неизвестна. Нами была проведена оценка биоразнообразия бактериальных сообществ, ассоциированных с клещами *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* and *D. reticulatus*, преобладающими на территории Западной Сибири и часто нападающими на людей, а также домашних и сельскохозяйственных животных. Клещи каждого вида были собраны в разных местах обитания. Все три точки сбора иксодидных клещей расположены в Новосибирской области и характеризуются схожим климатом.

Нами были обнаружены видо- и полоспецифические различия микробиомов иксодовых клещей. Различные алгоритмы кластеризации показали, что микробиомы видов клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus* различаются как по уровню альфа-разнообразия, так и по таксономической структуре сообществ. В целом, таксономическое разнообразие симбиотических микробиомов изучаемых клещей относительно невелико и уступает как разнообразию симбиотических систем высших животных, так и разнообразию в природных сообществах микроорганизмов. При этом альфа-разнообразие микробиомов клещей *I. pavlovskyi* достоверно превышает таковое для клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. Помимо альфа-разнообразия, были обнаружены различия в бактериальных доминантах микробиомов и представленности различных субдоминант. Вопрос о том, связана ли наблюдаемая разница с видом клеща, или определяется местом обитания клещей, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Три доминирующих рода бактерий, *Acinetobacter*, *Rickettsia* и *Francisella*, формируют 68% всего микробиома изучаемых клещей. Бактерии рода *Acinetobacter* являются свободноживущими аэробными сапрофитами, некоторые виды *Acinetobacter* являются типичными представителями нозокомиальных инфекций. При использовании 16S-профилирования *Acinetobacter* spp. были обнаружены в клещах *I. ricinus* (Carpí et al, 2011).

Доля бактерий рода *Rickettsia* в структуре микробиомов клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus* оказалась ожидаемо велика; при этом, в структуре микробиома клещей *I. pavlovskyi* доля риккетсий оказалась значительно меньше. Неизвестно, обусловлено ли это тем, что в различных популяциях клещей даже внутри одного региона доля инфицированных риккетсиями клещей может значительно варьировать, или же столь значительная межвидовая вариация связана с различным тропизмом *Rickettsia* spp. к разным, хотя и близкородственным видам клещей рода *Ixodes*. Использованный в амплификации фрагмент гена 16S рибосомальной РНК

является высококонсервативным для различных видов риккетсий, поэтому на основе его анализа нельзя установить видовую принадлежность обнаруженных риккетсий. Однако он позволил идентифицировать ДНК *Rickettsiales bacterium* 'Montezuma', относительно недавно открытой бактерии, которая, на основании филогенетического анализа, не отнесена ни к одному из семейств порядка *Rickettsiales* и образует в нем отдельный кластер. Ранее *Rickettsiales bacterium* 'Montezuma' были найдены только в *I. persulcatus*; в данной работе этот вид бактерий был впервые выявлен в *I. pavlovskyi*.

В одном из исследованных образцов самцов клещей *I. pavlovskyi* было обнаружено значительное количество бактерий рода *Rickettsiella* (более 23%), которые, как полагают, являются патогенными для клещей. Поскольку формирование пулов внутри групп происходило случайным образом, более вероятным предположением является присутствие в аномальном пуле только одного клеща, инфицированного большим количеством клеток *Rickettsiella*, нежели предположение об инфицированности большого количества клещей этого пула.

Бактерии из рода *Francisella* — грам-негативные внутриклеточные паразитические бактерии, к числу которых относятся возбудители туляремии (*F. tularensis*) и общего сепсиса (*F. philomiragia*). Бактерии этого рода составляют около половины всего микробиома клещей *D. reticulatus*, в то время как у исследуемых клещей рода *Ixodes* они были обнаружены не во всех библиотеках и в количествах, не превышающем 0.1%. В более ранних исследованиях была показана высокая инфицированность клещей рода *Dermacentor* этими бактериями, причем уровень инфицированности не соответствовал редкости трансмиссии заболевания при укусах клещей (Goerthert, Telford, 2010). Наше исследование подтверждает высокую встречаемость бактерий *Francisella* spp. в клещах *D. reticulatus* и показывает, что у клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* такой высокой инфицированности франциселлами нет.

Наиболее часто обнаруживаемыми в иксодовых клещах бактериальными патогенами являются бактерии рода *Borrelia*, *Ehrlichia* и *Anaplasma*. В нашем исследовании мы также обнаружили эти патогены в образцах клещей рода *Ixodes*, при этом доля боррелий в структуре микробиома не превышала 0.7%. Согласно исследованиям, посвященным изучению встречаемости боррелий в клещах рода *Ixodes* в исследуемом биотопе, до 50% клещей этого вида является носителями боррелий (Fomenko et al, 2008; Fomenko et al, 2010; Rar et al, 2005; Чаусов и соавт., 2009). У клещей *D. reticulatus*, обитающих в Западной Сибири, боррелий обнаружено не было, что согласуется с большинством исследований клещей этого вида, обитающих в других регионах (Lledó et al, 2014; Richter et al, 2013). В исследуемых образцах были обнаружены *Anaplasma* и *Ehrlichia*. У *I. persulcatus* были выявлены преимущественно *E. muris*, а в *I. pavlovskyi* — только *A. phagocytophilum* и, в одном образце, '*Candidatus* Neoerlichia mikurensis'. Остается непонятным, связаны ли эти различия с различным тропизмом *A. phagocytophilum*, *E. muris* по отношению к *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* или же с тем, что на различных

участках доля инфицированных *A. phagocytophilum* и *E. muris* клещей *Ixodes* spp. может значительно варьировать. Кроме того, у *D. reticulatus* также были обнаружены *E. muris*, что представляет первую находку *E. muris* в клещах данного вида. Следует, однако, учесть, что этот факт не доказывает способности клещей *D. reticulatus* передавать *E. muris* человеку.

Результаты исследования позволили обнаружить количественные различия в структуре микробиомов самцов и самок исследованных видов клещей, которые для клещей *I. persulcatus* были хорошо заметны уже на уровне классов бактерий. Обнаруженные полосспецифические различия требуют дальнейших исследований. Вместе с тем, выявление тех или иных бактерий с низкой представленностью методом 16S профилирования еще не свидетельствует о том, что они в норме присутствуют в микробиоме клещей. Поэтому представляет интерес оценка вариабельности микробиомов в индивидуальных клещах, а также исследование микробиомов клещей разных видов, обитающих совместно в одном локусе.

## **2. Полногеномное секвенирование боррелий**

Всего в работе секвенировали 3 изолята боррелий: *B. garinii* BgVir, *B. afzelii* Tom3007, *B. valaisiana* Tom4006. Все изоляты были культивированы к.м.н. О. В. Строниным в ФГУП «НПО Микроген» Минздрава РФ, филиал «НПО Вирион» в г. Томске. Все штаммы были культивированы на питательной среде BSK-H (Sigma) в течение четырех пассажей. ДНК была выделена с помощью набора Проба НК (ДНК-Технология) в соответствии с протоколом производителя. Стратегия секвенирования и геномной сборки для *B. garinii* и двух других штаммов боррелий различалась.

### **2.1. Секвенирование и анализ генома *B. garinii* BgVir**

Из ДНК штамма, выделенной после культивирования на питательной среде, была сконструирована фрагментная библиотека для платформы Roche GS FLX Библиотека была секвенирована в ЦКП “Геномика” СО РАН. Для сборки контигов *de novo* был использован программный пакет Newbler v.2.3 (Roche). В результате сборки было получено 97 контигов суммарной длиной 1,254,290 нуклеотидов. Значение N50 (наименьшая длина контига, при которой в контигах не меньшей длины содержится 50% суммарной длины контигов) составило 82,545 нуклеотида. Из-за наличия повторяющихся регионов с длиной, превышающей длину рида, полную последовательность мастер-хромосомы получить не удалось, что потребовало применения дополнительной операции скаффолдинга.

Ввиду невозможности выполнения скаффолдинга с использованием только фрагментных библиотек, а также с целью коррекции длины содержащихся в контигах поли-А повторов, из исходной ДНК была сконструирована парная библиотека для секвенирования на платформе ABI SOLiD v3.5. Средняя длина вставки между прямым и обратным ридами для парной библиотеки составила приблизительно 1000 нуклеотидов. Секвенирование сконструированной парной библиотеки на платформе ABI SOLiD v.3.5. было проведено в ЦКП “Геномика”. Было получено приблизительно 30 млн пар ридов, что соответствует 3 млрд



нуклеотидов. Скаффолд был собран с использованием пакета SOPRA v.1.4.6.

Для проверки полученного скаффолда была создана оригинальная программа «pairing\_for\_sort\_contigs», написанная на языке Perl. Исходными данными для программы является файл формата BAM, содержащий данные о картировании парных библиотек на собранные *de novo* контиги. Программа способна анализировать статистику пар, картированных на края контигов, и определять наиболее вероятную пару контига для склеивания в скаффолд. Программа опубликована на репозитории GitHub: <https://github.com/alexakur>.

В результате скаффолдинга была получена полная последовательность мастер-хромосомы исследуемой бактерии, а также полные последовательности плазмид Ip54 и cp26, в то время как остальные плазмиды образовали пул не полностью собранных фрагментов из 46 скаффолдов. Сложность в сборке плазмид боррелий состоит в большом количестве гомологичных участков между ними, в результате чего без физического разделения плазмид и их индивидуального секвенирования невозможно реконструировать их полные последовательности.

Поиск и аннотация генов в исследуемом геноме была выполнена с помощью пакетов GeneMark.hmm и Glimmer. Всего в мастер-хромосоме и двух полностью собранных плаزمиде был обнаружен 941 ген, из них 873 кодировали аминокислотные последовательности. 802 открытых рамки считывания были локализованы на мастер-хромосоме, 20 – на плазмиде cp26, 51 – на плазмиде Ip54. Для 255 ORF не удалось установить функцию гипотетического белка.

Полная последовательность мастер-хромосомы секвенированной бактерии *B. garinii* BgVir оказалась наиболее гомологичной геномной последовательности ранее секвенированного изолята *B. bavariensis* PBi на 98%. Большинство однонуклеотидных полиморфизмов, обнаруженных в мастер-хромосоме, является синонимичными. Наиболее значительной хромосомной перестройкой является инсерция в мастер-хромосоме BgVir локуса, содержащего ген KK9\_0542, гомологичного гену инозитол монофосфатазы. Этот локус присутствует в геноме *B. burgdorferi* B31 и отсутствует в геноме *B. bavariensis* PBi.

Полученные последовательности мастер-хромосомы, а также плазмид cp26, Ip54 были депонированы в базе данных GenBank под номерами CP003151, CP003202 и CP003201 соответственно.

## **2.2. Секвенирование и анализ геномов *B. afzelii* Tom3007 и *B. valaisiana* Tom4006**

Изоляты *B. afzelii* Tom3007 и *B. valaisiana* Tom4006 были выделены из самок клещей вида *I. persulcatus*, собранных на территории Томской области. Из полученных образцов ДНК были сконструированы парно-концевые библиотеки для секвенирования на платформе Illumina с помощью набора реактивов TruSeq (Illumina). Библиотеки были секвенированы на платформе Illumina Miseq с длиной прочтения прямого и обратного ридов в 150 нуклеотидов. Для *B. afzelii* Tom3007 было получено 3,2 млн ридов суммарной длиной 460 млн п.н; для *B. valaisiana* Tom4006 было получено 1,9 млн ридов суммарной длиной 273 млн п.н. Отчет по данным секвенирования приведен в таблице 3.



**Таблица 3** - Характеризация парно-концевых библиотек, сконструированных из ДНК *B. afzelii* Tom3007 и *B. valaisiana* Tom4006 для секвенирования на платформе Illumina Miseq, и результатов сборки *de novo*

Метрика	<i>B. afzelii</i> Tom3007	<i>B. valaisiana</i> Tom4006
Характеристика библиотек		
Количество ридов	3 193 382	1 856 087
Суммарная длина ридов	460 879 140	271 615 623
Результаты скаффолдинга		
Количество контигов	137	60
Суммарная длина контигов	1 297 327	1 297 745
Средняя длина контига	9 470	21 629
N50	689 056	695 669
N25	689 056	695 669

Сборку контигов и скаффолдов выполняли с помощью пакета CLC Genomics Workbench v.6.0.1. Для обоих штаммов мастер-хромосома была собрана в виде двух контигов, и были полностью реконструированы последовательности кольцевой плазмиды *cp26* и линейной плазмиды *lp54*. Как и в случае с *B. garinii* BgVir, реконструировать полные последовательности остальных плазмид представлялось невозможным ввиду обилия высокоомологичных участков между ними.

Объединение контигов мастер-хромосом и закрытие промежутка было выполнено с помощью методов сборки *de novo* ридов, чьи пары были картированы на края промежутка, с последующей проверкой аномалий покрытия картированием. Аннотация полученных геномов была выполнена с помощью системы автоматической аннотации бактериальных геномов NCBI PGAAP. Для изолята *B. afzelii* Tom3107 на последовательностях мастер-хромосомы, плазмиде *cp26* и плазмиде *lp54* было найдено 944 гена, из них 902 были белок-кодирующими. Для 244 ORF не удалось определить функцию. Для изолята *B. valaisiana* Tom4006 было найдено 945 генов, из них 899 белок-кодирующих. Функцию гипотетического белка не удалось определить для 234 ORF.

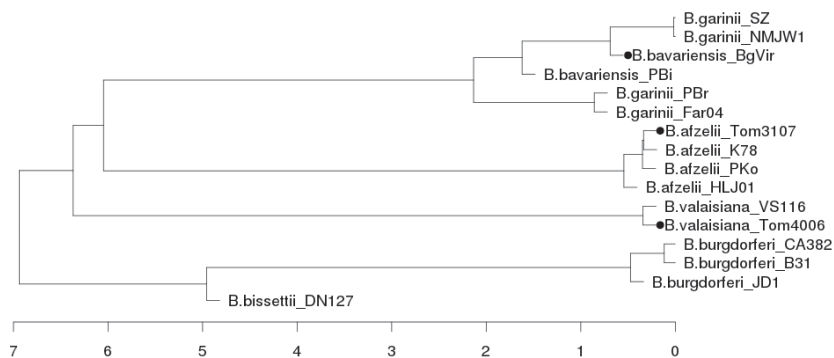
### 2.3. Сравнительный анализ секвенированных изолятов

Сравнение полногеномных последовательностей с присутствующими в базах данных соответствующими последовательностями различных штаммов боррелий было выполнено с помощью программы BLAST и ресурса PATRIC (<https://www.patricbrc.org>).

Для мастер-хромосомы *B. garinii* BgVir анализ BLAST против базы данных GenBank установил, что среди всех секвенированных изолятов наибольшую гомологию имеют изоляты *B. garinii* SZ, *B. garinii* NMJW1, *B. bavariensis* PBi со значениями BLAST Max score 7.369e+05, 6.052e+05, 5.037e+05, соответственно (Рисунок 6). Процент идентичности для этих референсных изолятов составил 99% для SZ и NMJW1, и 98% для PBi. Относительно наиболее близкого штамма мастер-

хромосома *B. garinii* BgVir содержит более 3000 нуклеотидных полиморфизмов.

Для мастер-хромосомы *B. afzelii* Tom3107 наиболее близкими изолятами были *B. afzelii* PKo (1.550e+06), *B. afzelii* K78 (1.266e+06), *B. afzelii* HLJ01 (6.643e+05). Степень гомологии исследуемого изолята с данными референсными последовательностями составила 99% (Рисунок 6). Степень гомологии с другими видами комплекса *B. burgdorferi* s. l. была ниже и составляла 92-94%. Для мастер-хромосомы *B. valaisiana* Tom4006 единственной референсной полногеномной последовательностью с идентичностью более 95% была последовательность изолята *B. valaisiana* VS116 (Рисунок 6). Значение BLAST Max score для этого изолята составило 1.656e+06. Степень гомологии с другими бактериями комплекса *B. burgdorferi* s. l. составляла 93-94%.



**Рисунок 6** – Дерево UPGMA-кластеризации, построенное на основе матрицы дистанций BLAST для полногеномного локального выравнивания BLASTn. Изоляты, циркулирующие на территории Западной Сибири, отмечены черными точками. Шкала расстояний приведена в процентах геномных различий.

#### 2.4. Обсуждение результатов полногеномного секвенирования боррелий

В рамках настоящей работы было секвенировано три штамма боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. Все штаммы были выделены из самок клещей *I. persulcatus*, собранных на территории Томской области. Перед выделением ДНК, каждый штамм был культивирован в течение 4 пассажей на питательной среде BSK-H. Выбор такого количества пассажей был обусловлен тем, что описана тенденция к потере плазмид боррелиями при многократных пассажах (Biskup et al, 2011).

Различия в стратегии секвенирования штаммов боррелий были обусловлены формированием приборно-технической базы и степенью развития алгоритмов сборки последовательностей *de novo*, существующими на момент проведения работ по секвенированию и сборке каждого штамма. *B. garinii* BgVir был первым секвенированным и проанализированным в рамках данной работы бактериальным штаммом. Работы по секвенированию и сборке генома BgVir выполнялись в 2011-2012 году. На тот момент времени максимальная средняя длина прочтения,

доступная платформам ВПС, составляла около 400 нуклеотидов, в случае секвенирования фрагментных библиотек на платформе Roche FLX. На этой платформе была секвенирована фрагментная библиотека изучаемого штамма BgVir, однако ввиду обилия в геноме боррелии гомологичных участков, а также для коррекции систематической ошибки платформы Roche в определении длины политрактвов, было решено дополнительно провести секвенирование парной библиотеки на платформе SOLiD. Картирование данных SOLiD на контиги собранные на основе данных Roche, позволило скорректировать длину около 40 политрактвов, локализованных в кодирующих областях контигов, приводивших к появлению сбой рамки считывания при выполнении автоматической аннотации последовательностей. Из общего пула контигов, представляющих плазмидную ДНК, даже с помощью парных библиотек удалось реконструировать полные последовательности только двух плазмид – cp26 и lp54. Эти плазмиды являются наиболее консервативными среди общего числа плазмид в группе *B. burgdorferi* s. l., и имеющими минимальное число участков, гомологичных с мастер-хромосомой и другими плазмидами. Реконструкция остальных плазмид без использования дополнительного секвенирования представлялась невозможной.

Секвенирование и анализ геномов изолятов *B. afzelii* Tom3007 и *B. valaisiana* Tom4006 проводилось в 2014 году. На тот момент в распоряжении ЦКП “Геномика” СО РАН появилась секвенирующая платформа Illumina Miseq, позволяющая секвенировать парно-концевые библиотеки с длиной прочтения 2x150 нуклеотидов.

Секвенирование парно-концевых библиотек с длиной вставки около 1000 нуклеотидов на этой платформе позволило реконструировать мастер-хромосомы обоих изолятов в виде двух контигов каждый, примерной длиной 690 т.п.н. и 210 т.п.н. Местом разрыва скаффолда в обоих случаях был локус с координатами около 210 т.п.н от начала мастер-хромосомы. Данный локус имеет гомологи в плазмидной ДНК боррелий, в результате чего алгоритм сборки был не способен разрешить этот повтор ввиду наличия нескольких альтернативных путей обхода симплифицированного графа де Брёйна. Для обоих штаммов реконструкция этого участка была проведена с помощью картирования ридов на наиболее гомологичные для исследуемых штаммов референсные геномы и вычисления консенсусной последовательности разрыва.

Аналогично штамму BgVir, для штаммов Tom4006 и Tom3007 удалось реконструировать плазмиды cp26 и lp54. Для реконструкции остальных плазмид необходимо или их физическое разделение с последующим индивидуальным секвенированием, или использование секвенирующих платформ с длиной прочтения не меньше 5000 нуклеотидов.

Сравнительный анализ, выполненный с помощью пакетов BLAST и PATRIC показал, что последовательности мастер-хромосом изучаемых изолятов отличаются от референсных штаммов в среднем на 1%. При средней длине мастер-хромосомы боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. в 905 млн п.н., это соответствует приблизительно 9000 нуклеотидных полиморфизмов. Таким образом, можно

утверждать, что изучаемые изоляты отличаются от боррелий, циркулирующих в других регионах.

Особо следует описать ситуацию с анализом геномной последовательности штамма *Borrelia* BgVir. Согласно результатам типирования изолятов боррелий на основе мультилокусного секвенирования (MLST), вид *B. garinii* был разделен на два вида: *B. garinii* и *B. bavariensis* (Margos, 2009). Из секвенированных и присутствующих в базе данных полногеномных последовательностей к виду *B. garinii* относятся изоляты *B. garinii* PBr и *B. garinii* Far04. Штамм *B. garinii* PBi стал прототипным штаммом *B. bavariensis*. Выполненный нами анализ результатов UPGMA-кластеризации на основе полногеномного локального выравнивания показал, что наряду со штаммом PBi, к виду *B. bavariensis* следует отнести также штаммы *B. garinii* SZ, *B. garinii* NMJW1 и проанализированный в данной работе штамм *B. garinii* BgVir.

Полученные последовательности являются базой для проведения дальнейших исследований, посвященных сравнительной и функциональной геномике боррелий группы *B. burgdorferi* s. l. Все последовательности мастер-хромосом и плазмид исследуемых штаммов были опубликованы в базах данных NCBI, в том числе базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank и базе данных геномных проектов NCBI Genomes.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы была исследована структура бактериальных сообществ, ассоциированных с клещами *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и *D. reticulatus*, собранных на территории Новосибирской области, при этом микробиомы клещей рода *Dermacentor* анализировали впервые. Результаты исследований показали, что структура проанализированных микробиомов достоверно различается между видами клещей, и около 54% суммарной дисперсии микробиомов определяется видом клеща. Поскольку представителей каждого вида клещей собирали в разных локусах, нельзя однозначно заключить, связана ли наблюдаемая вариация с особенностями биологии вида клеща, или она определяется вкладом бактериального сообщества конкретного местообитания. Вместе с тем, все три места сбора клещей находятся в одной географической зоне, характеризуются сходными климатическими условиями и составом прокормителей, поэтому мы полагаем, что, по крайней мере, часть обнаруженных различий в микробиомах клещей является видоспецифическими.

В данной работе впервые были обнаружены статистически значимые различия в структуре микробиомов самок и самцов клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy*, в то время как у клещей *D. reticulatus* такие различия были статистически незначимы. Пол клеща определяет 85,6% вариации микробиома клещей *I. persulcatus* и 67,1% вариации микробиома клещей *I. pavlovskiy*. Различия в структуре микробиомов взрослых самок и самцов клещей рода *Ixodes* могут быть связаны, с одной стороны, с различиями в строении половых органов, а, с другой стороны, с тем, что самки представителей этого рода существенно больше самцов и, следовательно, соотношение массы тела и площади поверхности у клещей этих видов различается.

Проведенные исследования показали, что более 60% структуры исследуемых микробиомов формировали последовательности бактерий *Acinetobacter* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella* spp., при этом биоразнообразие в микробиомах клещей *I. pavlovskiyi* достоверно выше, чем у клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. В ходе данной работы впервые в микробиомах клещей *I. pavlovskiyi* были обнаружены последовательности *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* и *A. phagocytophilum*, а в клещах *D. reticulatus* - *Ehrlichia* spp. Следует подчеркнуть, что выявление этих последовательностей, особенно в случае последовательностей эрлихий в клещах *D. reticulatus*, еще не свидетельствует о способности этих клещей переносить эти агенты людям. В целом, обнаружение в пулах клещей последовательностей не только *B. burgdoeferi* s. l., но и редко встречаемых патогенных бактерий – *B. miyamotoi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* – свидетельствует о том, что использованный подход может быть применен для относительно быстрой оценки эпидемического потенциала любого природного очага инфекций, переносимых клещами.

Вторая часть работы была связана с реконструкцией и анализом полногеномных последовательностей штаммов боррелий видов *B. bavariensis*, *B. afzelii* и *B. valaisiana*, выделенных из клещей *I. persulcatus*, собранных в Томской области. Для каждого штамма были реконструированы последовательности мастер-хромосомы, кольцевой плазмиды *srp* и линейной плазмиды *Ip54*. Полностью реконструировать последовательности других плазмид не удалось, хотя известно, что в клетках боррелий может присутствовать около 20 различных плазмид. К сожалению, особенности плазмидных последовательностей у боррелий, прежде всего наличие значительного числа межплазмидных перестроек и гомологичных участков, не позволяют реконструировать последовательности плазмид на основании только биоинформатических методов. Реконструировать полные последовательности плазмид было бы возможно со значительным увеличением длины рида, или же с помощью физического разделения плазмид и последующего секвенирования.

Методы полногеномной аннотации позволили идентифицировать 873, 902 и 899 открытых рамок считывания для штаммов *B. bavariensis* BgVir, *B. afzelii* Tom3107 и *B. valaisiana* Tom4006 соответственно. При этом для 255, 244 и 234 открытых рамок считывания соответственно не удалось установить функцию гипотетического белка. Уровень генетических отличий нуклеотидных последовательностей мастер-хромосом изучаемых изолятов от таковых соответствующих референсных штаммов составил около 1%. Это соответствует 4500-13500 нуклеотидным полиморфизмам относительно уже известных секвенированных штаммов боррелий соответствующих видов.

## ВЫВОДЫ

1. При реконструкции структуры микробиомов клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy*, *D. reticulatus*, обитающих в Новосибирской области, обнаружено, что:
  - в микробиомах клещей *I. persulcatus* обнаружен 81 род бактерий, клещей *I. pavlovskiy* - 115 родов, клещей *D. reticulatus* - 61 род;
  - более 60% структуры исследуемых микробиомов формировали бактерии классов Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria, родов *Acinetobacter*, *Rickettsia*, *Francisella*;
  - в исследуемых образцах клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* присутствовали последовательности *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., доля этих последовательностей не превышала 0.1%, за исключением образцов самцов клещей *I. pavlovskiy*, где доля *Borrelia* spp. составила 0.58%;
  - впервые в клещах *I. pavlovskiy* обнаружены последовательности *Anaplasma* spp. и *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, а в клещах *D. reticulatus* - *Ehrlichia* spp.
2. Сравнительный анализ биоразнообразия и таксономической структуры микробиомов изучаемых видов клещей показал, что:
  - уровень биоразнообразия у клещей *I. pavlovskiy* ( $H=3,86\pm 0,73$ ) достоверно выше, чем у клещей *I. persulcatus* ( $H=2,06\pm 0,27$ ) и *D. reticulatus* ( $H=2,01\pm 0,23$ );
  - структура микробиомов клещей изучаемых видов достоверно различается, вид клеща определяет 54% суммарной вариации исследуемых микробиомов;
  - структура микробиомов самцов и самок клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* достоверно различается, пол клеща определяет 85,6% вариации микробиома клещей *I. persulcatus* и 67,1% вариации микробиома клещей *I. pavlovskiy*.
3. В результате секвенирования, сборки *de novo* и аннотации геномов бактерий *B. bavariensis* BgVir, *B. afzelii* Tom3107 и *B. valaisiana* Tom4006, циркулирующих на территории Сибири, показано, что:
  - реконструированная последовательность *B. bavariensis* BgVir содержала 941 ген, из них на мастер-хромосоме локализованы 802 ORF, 20 ORF – на плазмиде cp26, 51 ORF – на плазмиде lp54;
  - реконструированная последовательность *B. afzelii* Tom3107 содержала 944 гена, из них на мастер-хромосоме локализованы 809 ORF, 26 ORF – на плазмиде cp26, 67 ORF – на плазмиде lp54;
  - реконструированная последовательность *B. valaisiana* Tom4006 содержала 943 гена, из них на мастер-хромосоме локализованы 812 ORF, 25 ORF – на плазмиде cp26, 62 ORF – на плазмиде lp54.
4. Установлена таксономическая принадлежность изолятов боррелий. Уровень генетических отличий мастер-хромосом изучаемых изолятов от таковых соответствующих референсных штаммов составил около 1%, что соответствует 4500-13500 нуклеотидных полиморфизмов. В последовательности мастер-хромосомы штамма *B. bavariensis* BgVir обнаружена инсерция содержащая ген KK9\_0542, гомологичный гену инозитол монофосфатазы.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kurilshikov A.M., Livanova N.N., Fomenko N.V., Tupikin A.E., Rar V.A., Kabilov M.R., Livanov S.G., Tikunova N.V. Comparative Metagenomic Profiling of Symbiotic Bacterial Communities Associated with *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi* and *Dermacentor reticulatus* Ticks // PLoS One – 2015. – V10(7). – e0131413.
2. Kurilshikov A.M., Fomenko N.V., Stronin O.V., Tikunov A.Y., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Tikunova N.V. Complete Genome Sequencing of *Borrelia valaisiana* and *Borrelia afzelii* Isolated from *Ixodes persulcatus* Ticks in Western Siberia // Genome Announc. – 2014. – V2(6) – e01315-14.
3. Курильщикова А.М., Ливанова Н.Н., Фоменко Н.В., Тикунова Н.В. Метагеномный анализ бактериального сообщества, ассоциированного с клещами *Ixodes persulcatus* // Вестник НГУ – 2013. – Т4. – С.13-21.
4. Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Stronin O.V., Fomenko N.V. Whole-genome sequencing of *Borrelia garinii* BgVir, isolated from Taiga ticks (*Ixodes persulcatus*) // J Bacteriol. – 2012. – V194(20). – P. 5713.
5. Курильщикова А.М., Тикунова Н.В., Кабилов М.Р. Методы и объекты метагеномных исследований // Вестник НГУ – 2012 – Т.1. – №10 – С.191-201.