

УДК 579.64

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕЩЕЙ *NEOSEIULUS CALIFORNICUS* (MESOSTIGMATA, PHYTOSEIIDAE) И ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО РАЗВЕДЕНИЯ КЛЕЩЕЙ

© 2024 г. Б.В. Андрианов^{а,*}, Л.А. Урошлев^{а,**}, О.В. Василенко^{б,***}, Ю.И. Мешков^{с,****}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, 119991 Россия

^бВсероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина, Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Московская обл. Пущино, 142290 Россия

^сФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская область, Одинцовский район, р.п. Большие Вяземы, 143050 Россия

*e-mail: andrianovb@mail.ru

**e-mail: leoniduroshlev@gmail.com

***e-mail: ovvasilenko@gmail.com

****e-mail: yimeshkov@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Проведено экспериментальное моделирование микробиоты лабораторной популяции хищных клещей *Neoseiulus californicus* (McGregor 1954), разводимых на кормовых паутиных клещах *Tetranychus urticae* (Koch 1836), с целью устранения бактериальных патогенов и повышения жизнеспособности линии клещей. Мы получили линию клещей *N. californicus* BioDefence2 от единственной оплодотворенной самки и производную линию с оптимизированной микробиотой BioDefence3. Оптимизацию микробиоты проводили последовательной обработкой линии клещей тетрациклином для устранения патогенных бактерий и затем — пробиотическими бактериями *Bacillus subtilis* для восстановления жизнеспособности линии клещей. Проведено сравнение микробиоты линий клещей BioDefence2 и BioDefence3 на основе метагеномных данных 16S rRNA генов. Определены виды бактерий, образующих микробиоту исходной и оптимизированной линий клещей. Основу как исходной, так и оптимизированной микробиоты *N. californicus* составляют сапрофитные почвенные бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* sp. и энтеробактерия *Enterobacter hormaechei*, известные также как оппортунистические патогены человека. Оптимизация микробиоты позволяет устранить внутриклеточную бактерию *Renibacterium salmoninarum*, известную как патоген рыб, и токсин-образующую бактерию *Clostridium botulinum*. Обсуждается влияние оптимизации микробиоты клещей на жизнеспособность популяции искусственного разведения *N. californicus*. Полученные результаты создают основу для совершенствования технологии разведения *N. californicus*.

Ключевые слова: Phytoseiidae, микробиота, пробиотические бактерии, 16S rRNA, метабаркодирование

DOI: 10.31857/S0044513424030011, **EDN:** VOABPP

Фитосейидный клещ *Neoseiulus californicus* (McGregor 1954), первоначально описанный как представитель рода *Typhlodromus* Scheuten 1857, широко используется для биологической борьбы с вредителями растений в условиях защищенного грунта, такими как обыкновенный паутиный

клещ (*Tetranychus urticae* (Koch 1836)), красный томатный паутиный клещ (*Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard 1960)) и другими мелкими вредителями, поражающими растения (Sanchez et al., 2008). Большое число видов жертв *N. californicus* и его способность переносить временные периоды голодания

(питаются пыльцевыми зернами растений) (Akyazi, Liburd, 2019) указывают на отсутствие строгой пищевой специализации этого вида хищных клещей, что вероятно отражается на составе его микробиоты. В настоящее время исследования микробиоты *N. californicus* и других видов фитосейидных клещей находятся в начальной стадии. До эпохи полногеномного секвенирования интерес исследователей к бактериальным симбионтам фитосейидных клещей фокусировался на внутриклеточных бактериях *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*, вызывающих сдвиг в соотношении полов в сторону самок и цитоплазматическую несовместимость инфицированных и свободных от инфекции линий клещей. Для обнаружения внутриклеточных бактерий использовались методы, основанные на идентификации генов бактерий методом ПЦР (Breeuwer, Jacobs, 1996; Johanowicz, Hoy, 1996; Weeks et al., 2003; Enigl, Schausberger, 2007). С появлением методов полногеномного секвенирования стали появляться работы с описанием всей микробиоты изучаемых клещей на основе метабаркодирования бактериальных генов (Andrianov, 2022). В работе Мерлина с соавторами (Merlin et al., 2023) изучен вопрос о влиянии растения хозяина на состав микробиоты системы “хищник — жертва” на примере пары видов *N. californicus* и *T. urticae* при развитии на растениях хлопчатника, кукурузы, обыкновенной фасоли или на томате. Предполагалось, что летучие фитонцидные соединения растений будут оказывать влияние на видовой состав микробиоты клещей. Тем не менее характеристика микробиоты на основе метабаркодирования по гену 16S rRNA выявила устойчивые качественные отличия микробиоты *N. californicus* от *T. urticae*, но влияние вида растения на микробиоту клещей не было обнаружено. Видовой состав микробиоты *N. californicus* в разных опытах оказался изменчив. Если принять интуитивно понятное допущение, что значимые для биологии клещей виды бактерий имеют высокую численность, то наибольшее значение для клещей *N. californicus* имеют бактерии из родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* и *Stenotrophomonas*.

Изучение микробиоты другой пары видов, образованной хищным фитосейидным клещом *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans 1930) и его жертвой акариевым клещом *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk 1781), методом метабаркодирования гена 16S rRNA также выявило радикальные различия микробиоты хищника и жертвы (Pekas et al., 2017). Микробиота хищного клеща образована преимущественно видами бактерий из родов *Brevibacterium*, *Staphylococcus* и *Bacillus*, причем на долю *Staphylococcus kloosii* (Schleifer et al. 1985) приходится 61–72% всех бактерий. Еще 12–14% приходится на *Staphylococcus saprophyticus* (Fairbrother 1940). Эти бактерии отсутствуют в чистых культурах клеща *T.*

putrescentiae. Его микробиота содержит преимущественно *Blattabacterium-like* и *Solitalea-like* бактерии. Типичные для человека кишечные бактерии *Escherichia coli*, *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. и *Propionibacterium* немногочисленны и вероятно случайны в микробиоте клещей.

В недавно опубликованной работе с использованием секвенирования по Sanger фрагментов 16S rRNA гена и традиционных микробиологических подходов проведено изучение микробиоты трех видов фитосейидных клещей: *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot 1957), *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot 1962 и *Neoseiulus cucumeris* (Sumner-Kalkun et al., 2023). Полученные данные подтвердили вывод из работы Пекас с соавторами (Pekas et al., 2017) о большой численности популяции бактерий *S. kloosi* в микробиоте *N. cucumeris*. Обнаружение *S. kloosi* в микробиоте *N. cucumeris* двумя независимыми методами указывает на важную роль этой бактерии для биологии *N. cucumeris*. Основными представителями микробиоты *A. swirskii* и *N. cucumeris* являются *Serratia marcescens* NECW30 (Bizio 1823) и *Elizabethkingia meningoseptica* (King 1959) Kim et al. 2005 из группы энтеробактерий. Микробиота *P. persimilis* существенно отлична. Наибольшую представленность имеют *S. maltophilia* PHPW29, *Serratia odorifera* (Grimont et al. 1978) и *Arthrobacter* sp. PHPS1 (Conn and Dimmick 1947). Эксперименты по обработке *P. persimilis* двумя видами бактерий из рода *Serratia* показали их контрастное влияние на параметры жизнеспособности популяции (Sumner-Kalkun et al., 2023). Обработка клещей бактерией *S. marcescens*, характерной для микробиоты других видов фитосейид, снижала выживаемость, плодовитость и активность питания, но другой вид бактерий из рода *Serratia* — *S. odorifera* из микробиоты *P. Persimilis* — действовала противоположно, проявляя свойства пробиотика для *P. persimilis*. Следует отметить, что патогенность *S. marcescens* ранее отмечалась для лабораторных популяций клещей *Galendromus* (*Galendromus*) *occidentalis* (Nesbitt 1951), у которых инфекция этой бактерией приводит к нарушению пищеварения и прилипанию клещей к субстрату (Hoy, Jeyaparakash, 2005, 2008).

Особое практическое значение для использования фитосейидных клещей как агентов биоконтроля имеют патогенные виды бактерий. В настоящее время доказана патогенность для клещей нескольких видов бактерий. Для лабораторной линии клеща *P. persimilis* был описан синдром “невосприимчивости” или non-responding (NR) syndrome, характеризующийся уменьшением размеров взрослых особей, сокращением продолжительности жизни и плодовитости клещей, а также снижением их активности в питании паутиными клещами. В ногах зараженных клещей наблюдались кристаллы.

Причиной синдрома невосприимчивости оказалась спонтанная инфекция штаммом бактерии *Acaricomes phytoseiuli* DSM 14247 (Pukall et al. 2006). Ее роль в патогенезе данного синдрома была подтверждена возможностью инфицировать клещей из нормальных линий в соответствии с постулатами Коха (Gols et al., 2007; Schütte et al., 2008).

Наличие бактерии *Oligosporidium occidentalis* ассоциировано с заболеванием клещей *Gelendromus* (*Galendromus*) *occidentalis* (Becnel et al., 2002), а фитопатогенная бактерия *Brenneria salicis* (Day 1924) Hauben et al. 1999 ассоциирована с заболеванием *N. cucumeris* (Hoy, Jeyaparakash, 2008; Pekas et al., 2017). У фитосейидных клещей обнаружены широко распространенные среди видов членистоногих внутриклеточные бактерии *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma* (Enigl, Schausberger, 2007; Wu, Hoy, 2012; Famah et al., 2014). В настоящее время нет данных об облигатности симбиоза каких-либо штаммов бактерий из этой группы и фитосейидных клещей. Вероятно, симбиоз имеет факультативный характер. Наличие этих бактерий может быть бессимптомным и часто ассоциировано со сдвигом соотношения полов в пользу самок и с цитоплазматической несовместимостью, обнаруживаемой при скрещивании линий с разным инфекционным статусом (Wu, Hoy, 2012).

В данном сообщении мы впервые для популяций фитосейидных клещей, используемых в практике защиты растений в России, приводим данные метабаркодирования их микробиоты. Под микробиотой мы понимаем совокупность видов бактерий, определяемых по нуклеотидной последовательности бактериального гена 16S rRNA. В работе изложены результаты эксперимента по оптимизации микробиоты популяции *N. californicus* путем последовательной обработки клещей антибиотиком (тетрациклином) и пробиотической бактерией *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872 с целью оптимизации технологии разведения хищного клеща и повышения эффективности его применения для контроля паутинных клещей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии клещей *Neoseiulus californicus*

Хищные клещи *N. californicus* для данного исследования были получены из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (Glinushkin et al., 2019) и разводилась в культуре на кормовых паутинных клещах *T. urticae*. Культуру *N. californicus* выращивали при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 90% и продолжительности светового дня 20 часов. Для проведения экспериментов

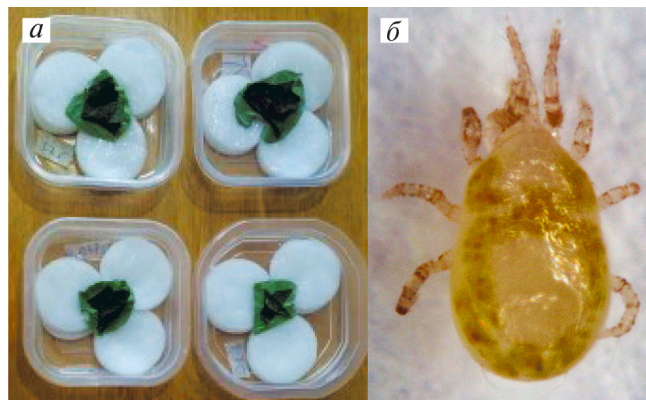


Рис. 1. Экспериментальная установка для разведения лабораторных линий *N. californicus*: а — плоты листьев фасоли, которые заражены паутинными клещами и на которых в контролируемых условиях питаются клещи *N. californicus*; б — самка *N. californicus*, в центре тела просвечивает созревающее яйцо. Фотография Ю.И. Мешкова.

в контролируемых условиях использовались плоты, в которых клещи питались на листьях фасоли, окруженных водой, что предотвращало рассеивание клещей (рис. 1а).

На каждый плот помещали по 10 самок *N. californicus*. Кормление *N. californicus* проводили на 3-й и 5-й дни, помещая на лист фасоли паутинных клещей. Количество клещей подсчитывали через 7 дней после начала эксперимента, что соответствует жизненному циклу *N. californicus* от яйца до имаго. Мы получили линию клещей *N. californicus* BioDefence2 от единственной оплодотворенной самки и производную линию с оптимизированной микробиотой BioDefence3. Линия BioDefence2 служила контрольной группой в эксперименте по оптимизации микробиоты линии BioDefence3.

Оптимизацию микробиоты проводили последовательной обработкой линии клещей тетрациклином для устранения патогенных бактерий и затем обработкой пробиотическими бактериями *B. subtilis* для восстановления жизнеспособности линии клещей. Для обработки тетрациклином использовался тетрациклин гидрохлорид для микробиологии от фирмы “Helicon” (<https://www.helicon.ru/catalog/reagenty/kultivirovanie-kletok/antibiotiki/tetratsiklina-gidrokhlord-art-srl-38614/>). Концентрированный раствор 30 мг/мл получали в 70% спирте и разводили водой в 10 раз непосредственно перед опрыскиванием листьев фасоли с культурой паутинных клещей. Непосредственная обработка *N. californicus* тетрациклином невозможна, так как опрыскивание раствором антибиотика вызывает их гибель. Для обработки *N. californicus* тетрациклином мы использовали паутинных клещей, резистентных к опрыскиванию раствором тетрациклина

и выращенных на обработанных антибиотиком листьях фасоли. Концентрацию тетрациклина подбирали экспериментально для каждой партии тетрациклина в предварительных опытах с последовательными двукратными разведениями основного раствора антибиотика. Концентрация тетрациклина в два раза меньшая, чем токсичная доза, вызывающая частичную гибель лабораторной популяции *N. californicus*, была выбрана для опыта. Через сутки после обработки листа фасоли использовали для загрузки плотов хищными клещами или для подкормки клещей на плотках. Для получения обработанной тетрациклином линии, клещи проходили весь жизненный цикл от яйца до яйца на обработанных тетрациклином листьях. Для этого родителей удаляли после откладки яиц, а клещей, вышедших из яиц, дорастивали на листьях, обработанных тетрациклином, до взрослой стадии. Через 7 дней поколение клещей *N. californicus*, выросшее на обработанных тетрациклином листьях, собирали и переносили на плоты, не обработанные тетрациклином, но опрысканные 5% раствором спор *B. subtilis* для восстановления жизнеспособности линии клещей. В качестве пробиотических бактерий мы использовали суспензию спор бактерий рода *Bacillus* производства фирмы “Chisal NV” (Belgium), поставщик в России – фирма “Пробиотика” (https://probiotika.ru/chrisal_products/stb_-_nasishenie_prostranstva/215594/). Исходный препарат “Сенная палочка”, являющийся суспензией спор бактерий с концентрацией 5×10^7 живых бактерий в одном миллилитре, разводили стерильной водой перед опытом в 20 раз для активации бактерий и опрыскивали листья с клещами ежедневно. После откладки яиц родителей удаляли, и поколение клещей, выросшее на листьях с пробиотическими бактериями, вели далее как производную линию BioDefence3. Культивирование линии BioDefence3 вели при ежедневном опрыскивании пробиотическими бактериями. Всего для выделения суммарной ДНК было получено 30 плотов с клещами линии BioDefence2 и 30 плотов с клещами линии BioDefence3. Перед выделением суммарной ДНК клещей переносили в культуральный флакон без кормовых клещей, где они голодали в течение двух суток. Далее взрослых клещей индивидуально собирали в лизирующий раствор для выделения суммарной ДНК и определения нуклеотидной последовательности хологена линии клещей.

Выделение суммарной ДНК линии клещей и определение нуклеотидной последовательности ее хологена методом нанопорового секвенирования длинных фрагментов ДНК

Высокомолекулярную ДНК для нанопорового секвенирования выделяли с помощью классического фенол-хлороформного метода с Протеиназой К, модифицированного для выделения высокомолекулярной ДНК. Примесь РНК удаляли обработкой

рибонуклеазой T1. Качество и чистоту выделенной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК определяли с помощью флуорометра Qubit (Invitrogen) и наборов реагентов (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen). Заключительный этап выделения высокомолекулярной ДНК проводили на магнитных шариках с использованием буфера для больших фрагментов (LFB) из набора SQK-LSK110 (Oxford Nanopore Technologies). Для подготовки библиотеки концы молекул ДНК достраивались, а затем лигировались с адаптерами с помощью модуля NEBNext Companion Module. Библиотеки для нанопорового секвенирования готовили при помощи набора SQK-LSK110 (Oxford Nanopore Technologies). Секвенирование геномной библиотеки проводилось на потоковой ячейке MinION R9.4.1 на приборе MinION нанопор секвенатор 512 каналов (Oxford Nanopore Technologies) под управлением программы MinKNOW v.5.1.0. Сохраняли риды с длиной более 200 п.н. Бейсколлинг проводили на сервере с графическим процессором при помощи программы Guppy (v6.0.1+652ffd179) (<https://github.com/asadprodhan/GPU-accelerated-guppy-basecalling>). Сборку контингов из первичных чтений вели в программе canu v.2.3 assembler (Koren et al., 2017). N50 для полученных сборок было равно 97122 п.н. для сборки BioDefence2 и 44867 п.н. для сборки BioDefence3, что говорит о достаточно хорошем качестве сборки. Качество сборки генома *N. californicus* было проверено в программе BUSCO ver. 5.4.2. (Manni et al., 2021). При оценке качества мы получили 77.1% корректно собранных генов домашнего хозяйства для BioDefence2 и 79.3% для BioDefence3. Для поиска генов использовалась программа AUGUSTUS (Stanke et al., 2006). Аннотацию собранных генов проводили в программе OrthoFinder (Emms, Kelly, 2019), которая собирает ортологичные гены в группы. Выявленные гены выравнивали на базу данных nr с помощью программы BLAST. Сборки хологена двух линий *N. californicus* BioDefence2 и BioDefence3 были размещены в базе данных GenBank. Сборки последовательностей, присоединенные к проекту BioDefence2, доступны по номеру SRR23949036. Все данные проекта зарегистрированы с номером BioProject ID PRJNA946627. Сборки последовательностей, присоединенные к проекту BioDefence3, доступны по номеру SRR26395938. Все данные проекта зарегистрированы с номером BioProject ID PRJNA1028568.

Для проведения метагеномного анализа мы извлекли из геномного проекта все последовательности прокариотического гена 16S rRNA с помощью программы Centrifuge и базу данных NCBI в качестве референса (Kim et al., 2016). Все последовательности, принадлежащие более чем одному виду бактерий, мы классифицировали как химерные и удалили их. В результате мы нашли наиболее

сходные последовательности известных видов бактерий и провели идентификацию всех видов микробиоты *N. californicus*. Каждый из идентифицированных видов бактерий характеризуется числом относящихся к нему последовательностей в геномном проекте или параметром NumReads, который является ранговой оценкой количества бактерий данного вида в микробиоте. Систематическое положение идентифицированных видов бактерий представлено в виде дерева, построенного в программе Krona (Ondov et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Виды бактерий, образующие микробиоту линий *N. californicus*, были определены в результате мета-баркодирования полученных хологеномов по гену 16S rRNA. В результате организм — источник полученных нуклеотидных последовательностей — был определен до вида, и получен список видов бактерий, образующих микробиоту клеща. Мы ограничи свой анализ бактериями, так как идентификация бактерий по генам 16S rRNA максимально надежна, а референсная база имеет минимальное число ошибок, по сравнению с грибами. Каждый из идентифицированных таким образом видов бактерий характеризуется числом чтений, картированных на геном, или числом numReads. Число numReads может быть использовано для ранговой оценки количества бактерий данного вида в микробиоте клеща и, следовательно, дает качественную оценку значимости этого вида бактерий для изучаемой популяции *N. californicus*. Полученная оценка не является количественной, так как бактерии с прочными клеточными стенками неизбежно будут представлены меньшим числом прочтений, чем виды бактерий с тонкими клеточными стенками из-за разницы в эффективности выделения ДНК. Тем не менее сравнение микробиоты линий BioDefence2 и BioDefence3 возможно, так как выделение ДНК из клещей этих линий проводили одним методом, и состав видов микробиоты обеих линий сходен. Сравнение видового состава микробиоты линий BioDefence2 и BioDefence3 представлено на рис. 2 и в табл. 1.

При построении диаграммы использованы первые 50 видов бактерий микробиоты каждой из линий с максимальным значением параметра NumReads. Основу микробиоты обеих линий *N. californicus* BioDefence2 и BioDefence3 составляют сапрофитные аэробные почвенные бактерии *S. maltophilia*, *Acinetobacter* sp. и энтеробактерия *Enterobacter hormaechei* (Hormaeche and Edwards 1960).

S. maltophilia — почвенная аэробная грамм-негативная, подвижная бактерия, биопленкообразователь и оппортунистический патоген человека,

высокоустойчивый к большинству антибиотиков. Эта бактерия также является компонентом микробиоты ротовой полости разводимых в террариумах видов змей (Hejnar et al., 2007). У близкородственного вида фитосейид *N. cucumeris* данный вид отмечается, но как малочисленный (Pekas et al., 2017). Напротив, *S. kloosii*, образующий основу микробиоты *N. cucumeris*, у *N. californicus* найден в небольшом количестве и только в линии BioDefence2. Так как *S. maltophilia* и *S. kloosii* относятся к одной экологической группе бактерий — почвенные сапрофиты, то, вероятно, они могут замещать друг друга у разных видов фитосейидных клещей. Вполне закономерно, что вторая по массовости группа бактерий микробиоты образована кишечными бактериями *E. hormaechei* и *E. coli*. Эти виды бактерий, предпочитающие среду с высокой концентрацией аминокислот, отражают особенности питания *N. californicus* животной пищей с высокой долей белков.

Интересно наличие в линии BioDefence2 необычной для членистоногих внутриклеточной патогенной бактерии *R. salmoninarum*, способной инфицировать рыб и распространяться в их популяциях как “горизонтально” путем инфекционной передачи между особями, так и “вертикально” через икру (Rozas-Serri et al., 2020). Также в линии BioDefence2 обнаруживается высокая численность токсин-образующей бактерии *Clostridium botulinum* (van Ermengem 1896) Bergey et al. 1923. Оптимизация микробиоты в линии BioDefence3 устраняет оба эти вида бактерий.

Сравнение микробиоты линий BioDefence2 и BioDefence3 позволяет выделить группу бактерий, обнаруживаемых в обеих линиях клещей, кроме тех, что были перечислены ранее. К ним относятся почвенные бактерии и оппортунистические патогены человека: *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889), *Salmonella enterica* (ex Kauffmann & Edwards 1952) Le Minor & Popoff 1987), *Pantoea dispersa* (Gavini et al. 1989), *Acinetobacter baumannii* (Bouvet and Grimont 1986). Устойчивость их в микробиоте *N. californicus* возможно связана с природной устойчивостью некоторых штаммов этих бактерий к большинству антибиотиков (Yang et al., 2023).

Существенные изменения микробиоты линий BioDefence2 и BioDefence3 ставят вопрос о влиянии этих изменений на жизнеспособность и эффективность размножения клещей. Для количественного сравнения эффективности размножения клещей измеренной числом полученных клещей в стандартных опытах, линии клещей BioDefence2 и BioDefence3 культивировали параллельно в одном помещении и в одинаковых условиях, обеспечивающих оптимальную скорость роста на плотках, как описано в разделе “Материалы и методы”. Подсчеты числа клещей проводили на 7-й день эксперимента.

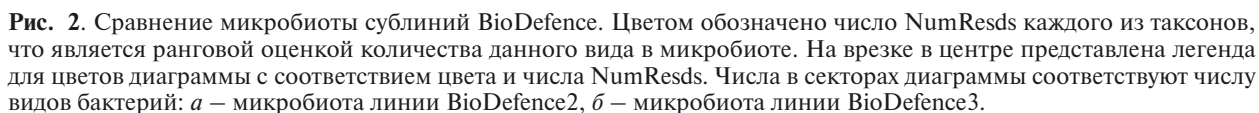


Таблица 1. Сравнение микробиоты *N. californicus* линий BioDefence2 и BioDefence3

№	Группа бактерий	Бактериальная микробиота BioDefence2 (исходная линия)	Бактериальная микробиота BioDefence3 (обработанная линия)
1	Enterobacterales	<i>Enterobacter</i> sp. <i>LUI</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>RHBSTW-00975</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Mixta intestinalis</i> <i>Pantoea dispersa</i> <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2			<i>Klebsiella oxytoca</i>
3			<i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pantoea dispersa</i>
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14	Xanthomonadales	<i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>ASS1</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
15		<i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>WZN-1</i>	
16		<i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>PAMC25021</i>	
17		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
18		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>R551-3</i>	
19		<i>Lysobacter</i> sp. <i>HDW10</i>	
20	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas alkylphenolica</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>S1-A32-2</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>XBB1</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
21			<i>Pseudomonas protegens</i>
22			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23			<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
24			<i>Pseudomonas putida</i>
25			<i>Pseudomonas stutzeri</i>
26			<i>Acinetobacter baumannii</i>
27			
28			
29			
30			
31	Aeromonadales	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
32			<i>Aeromonas veronii</i>
33			
34	Vibrionales		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
35	Burkholderiales		<i>Burkholderia cenocepacia</i>
36			<i>Burkholderia cepacia</i>
37			<i>Burkholderia multivorans</i>
38			<i>Burkholderia ubonensis</i>
39			<i>Burkholderia gladioli</i>
40			<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>
41			<i>Burkholderia pseudomallei</i>
42			<i>Ralstonia solanacearum</i>
43			<i>Achromobacter denitrificans</i>
44			<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
45			<i>Bordetella hinzii</i>

Таблица 1 (окончание).

№	Группа бактерий	Бактериальная микробиота BioDefence2 (исходная линия)	Бактериальная микробиота BioDefence3 (обработанная линия)
46	Nitrosomonadales	<i>Methylophilus</i> sp. TWE2	
47	Hyphomicrobiales		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
48			<i>Rhizobium leguminosarum</i>
49			<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
50	Rhodospirillales		<i>Azospirillum brasilense</i>
51	Sphingomonadales		<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
52	Actinomycetia	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	
53		<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC33209	
54		<i>Neomicrococcus aestuarii</i>	
55		<i>Leucobacter denitrificans</i>	
56		<i>Brevibacterium</i> sp. WO024	
57		<i>Amycolatopsis methanolica</i> 239	
58			<i>Streptomyces lydicus</i>
59			<i>Streptomyces albus</i>
60			<i>Streptomyces venezuelae</i>
61			<i>Streptomyces lincolnensis</i>
62			<i>Micrococcus luteus</i>
63			<i>Cutibacterium acnes</i>
64			<i>Rhodococcus ruber</i>
65	Bacillales	<i>Staphylococcus succinus</i>	
66		<i>Staphylococcus kloosii</i>	
67		<i>Peribacillus simplex</i> NBRC15720 = DSM 1321	
68		<i>Oceanobacillus</i> sp. 160	
69		<i>Kurthia</i> sp. 11kri321	
70			<i>Bacillus cereus</i>
71			<i>Bacillus thuringiensis</i>
72	Myxococcales		<i>Myxococcus xanthus</i>
73			<i>Sorangium cellulosum</i>
74	Eubacteriales	<i>Clostridium botulinum</i>	
75	Acholeplasmatales	<i>Acholeplasma palmae</i>	
76		<i>Acholeplasma axanthum</i>	
77	Chroococcidiopsidales	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC7203	
78	Synechococcales	<i>Synechococcus</i> sp. JA-3–3Ab	
79	Flavobacteriales	<i>Chryseobacterium glaciei</i>	
80		<i>Chryseobacterium</i> sp. G0201	
81		<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	
82		<i>Chryseobacterium carnipullorum</i>	
83		<i>Fluviicola taffensis</i> DSM 16823	
84	Sphingobacteriales	<i>Sphingobacterium</i> sp. B29	
85	Chlorobiaceae	<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> BU-1	
86		<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> DSM 266	
87	Thermotogales	<i>Pseudothermotoga hypogea</i> DSM 11164 = = NBRC106472	
88		<i>Pseudothermotoga thermarum</i> DSM 5069	

Примечания. В сравнение включены первые 50 видов бактерий с максимальным значением параметра NumReads. Патогенные и образующие токсин виды бактерий из состава микробиоты линии BioDefence2 выделены жирным шрифтом.

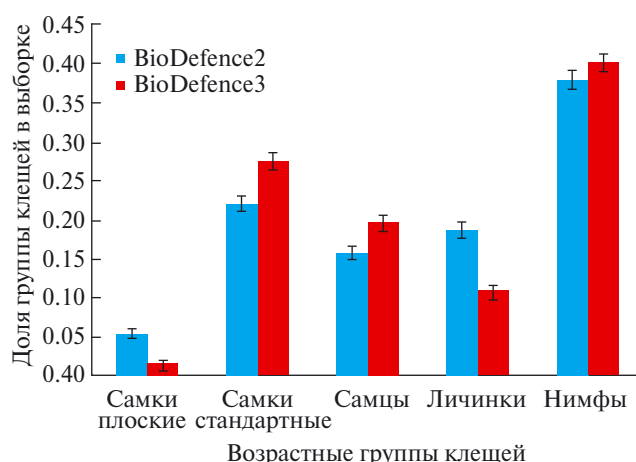


Рис. 3. Демографическая структура клещей в линиях BioDefence2 и BioDefence3 на 7-й день эксперимента. Синим цветом показана линия BioDefence2, красным цветом — линия BioDefence3. Отрезками указаны 95% доверительные интервалы ошибки доли. По вертикальной оси — доля группы клещей во всей выборке. По горизонтальной оси — группы клещей. Суммированы данные 30 повторностей эксперимента на листовых вырезках для каждой из линий. Всего получено 1576 клещей всех возрастов линии BioDefence2 и 1967 клещей линии BioDefence3.

Выявлено достоверное увеличение числа полученных клещей линии BioDefence3 по сравнению с контрольной линией BioDefence2 (рис. 3).

Для характеристики жизнеспособности опытной и контрольной популяций мы оценивали внешний вид самок по двухбалльной шкале. Нормальные активно питающиеся самки имеют вздутое тело, причем степень вздутия увеличивается у самок, несущих яйца (рис. 1б). Помимо нормальных самок в популяции всегда есть некоторое количество вялых самок с плоским телом, которые практически не питаются. Причин этого явления может быть много, но одной из вероятных причин может быть наличие патогенных видов бактерий, вызывающих отравление клещей. На основании визуального наблюдения мы разделили всех самок на плоских и нормальных. Наблюдаются достоверное снижение доли плоских самок с 20% в контрольной группе до 6% в линии BioDefence3 и увеличение числа полученных в эксперименте взрослых клещей, как самцов, так и самок (рис. 3). Результаты количественных подсчетов роста популяции в контролируемых условиях эксперимента свидетельствуют об эффективности двойной последовательной обработки популяции клеща тетрациклином и пробиотиком *B. subtilis* для стабилизации размножения культуры *N. californicus*.

Данные геномного секвенирования позволяют провести генетическую идентификацию линий клещей. Для этого мы извлекли из полученных геномов линий BioDefence2 и BioDefence3 последовательности гена 18S rRNA и провели их сравнительный анализ. Как и ожидалось, нуклеотидная последовательность гена 18S rRNA длиной 1181 п.о. идентична у линий BioDefence2 и BioDefence3 и отличается от генетически охарактеризованных линий *N. californicus* уникальными нуклеотидными заменами. Наибольшее сходство полученных нами последовательностей наблюдается с последовательностями гена 18S rRNA *N. californicus*, опубликованными в работе (Sonoda et al., 2012). Различия ограничены точковыми мутациями. Замены G на A наблюдаются в позициях 134, 302 и 1045 при сравнении с генотипами изолятов 89NcSPN1, 02NcaCI и 87NcFT1 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном сообщении мы приводим результаты метабаркодирования микробиоты *N. californicus* по гену 16S rRNA и сравнительного анализа изменений микробиоты двух полученных нами линий *N. californicus* BioDefence2 и BioDefence3 в результате обработки тетрациклином и пробиотическими бактериями *B. subtilis*. Ранее метабаркодирование микробиоты *N. californicus* было проведено в работе Мерлина с соавторами (Merlin et al., 2023). В ней было показано, что основу микробиоты *N. californicus* составляют бактерии из родов *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*. Совпадение с нашими данными наблюдается в случае *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Эти бактерии наиболее вероятно являются обязательными компонентами микробиоты *N. californicus*, и среди них можно ожидать наличия пробиотических штаммов, повышающих жизнеспособность популяции клещей и защищающих их от патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Аналогичный результат недавно был получен при изучении микробиоты *P. persimilis* (Sumner-Kalkun et al., 2023). В составе микробиоты *P. persimilis* была обнаружена бактерия *S. odorifera*, а затем были показаны пробиотические свойства найденного штамма для клеща *P. persimilis*.

Наличие в микробиоте *N. californicus* бактерий, известных образователей токсинов, позволяет предполагать, что в настоящее время состав микробиоты культуры *N. californicus* не является оптимальным. Для оптимизации микробиоты клещей необходимы удаление патогенных видов бактерий и замена их на пробиотические виды бактерий.

В данной работе мы показали возможность улучшения параметров материнских культур *N. californicus*, выращенных на паутином клеще *T. urticae*. Устранение чувствительной к тетрациклину микрофлоры клещей и модуляция микробиоты *N. californicus* путем обработки популяции пробиотической бактерией *Bacillus subtilis* приводят к увеличению скорости роста популяции *N. californicus* и снижению доли неактивных клещей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ имеющейся литературы показывает, что жизнеспособность и эффективность применения популяций фитосейидных клещей как агентов биоконтроля в значительной степени зависит от состава микробиоты линии. Без необходимого контроля популяция клещей быстро накапливает патогенные виды бактерий в составе своей микробиоты и становится неэффективной как агент биоконтроля. Субклонирование популяции путем получения линии от одной самки является эффективным методом устранения патогенных микроорганизмов. Вторым подходом к повышению эффективности применения фитосейидных клещей является моделирование микробиоты системы: “фитосейидный клещ — кормовой клещ” на стадии лабораторного разведения. В представленной работе мы применили оба подхода для оптимизации микробиоты популяции клещей искусственного разведения *N. californicus*. Клещи полученной нами линии BioDefence3 очищены от патогенных бактерий *R. salmoninarum* и *C. botulinum*. Удаление бактерий, продуцирующих токсины, коррелирует с уменьшением доли “неэффективных” самок, что указывает на перспективность предложенного подхода для поддержания жизнеспособности популяций *N. californicus*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ), грант 22-24-00727.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных, соответствующих критериям Директивы 2010/63/EU.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Akyazi R., Liburd O.E., 2019. Biological Control of the Twospotted Spider Mite (Trombidiformes: Tetranychidae) with the Predatory Mite *Neoseiulus californicus* (Mesostigmata: Phytoseiidae) in Blackberries // Florida Entomologist. V. 102. P. 373–381. <https://doi.org/10.1653/024.102.0217>
- Andrianov B.V., 2022. Bacterial Symbionts and Pathogens in Populations of Phytoseiidae Mites (Phytoseiidae, Mesostigmata) // Biology Bulletin Reviews. V. 12. P. S78–S84. <https://doi.org/10.1134/S2079086422070027>
- Becnel J.J., Jeyaprasakash A., Hoy M.A., Shapiro A., 2002. Morphological and molecular characterization of a new microsporidian species from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Phytoseiidae) // Journal of Invertebrate Pathology. V. 79. № 3. P. 163–172. [https://doi.org/10.1016/s0022-2011\(02\)00032-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00032-0)
- Breeuwer J.A.J., Jacobs G., 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction // Experimental and Applied Acarology. V. 20. P. 421–434.
- Emms D.M., Kelly S., 2019. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics // Genome Biology. V. 20. P. 238. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>
- Enigl M., Schausberger P., 2007. Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey // Experimental and Applied Acarology. V. 42. P. 75–85. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9080-3>
- Famah S.N., Hanna R., Breeuwer J.A., et al., 2014. The endosymbionts *Wolbachia* and *Cardinium* and their effects in three populations of the predatory mite *Neoseiulus paspalivorus* // Experimental and Applied Acarology. V. 64. P. 207–221. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9820-0>
- Glinushkin A.P., Yakovleva I.N., Meshkov Y.I., 2019. The impact of pesticides used in greenhouses, on the predatory mite *Neoseiulus californicus* (parasitiformes, phytoseiidae) // Rossiiskaia selskokhoziaistvennaia nauka. V. 3. P. 32–34. <https://doi.org/10.31857/S2500-26272019332-34>
- Gols R., Schutte C., Stouthamer R., et al., 2007. PCR-based identification of the pathogenic bacterium, *Acaricomes phytoseiuli*, in the biological control agent *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) // Biological Control. V. 42. P. 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.06.001>
- Hejnar P., Bardon J., Sauer P., Kolár M., 2007. *Stenotrophomonas maltophilia* as a part of normal oral bacterial flora in captive snakes and its susceptibility to antibiotics // Veterinary Microbiology. V. 121. P. 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.026>
- Hoy M., Jeyaprasakash A., 2005. Microbial diversity in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari:

- Phytoseiidae) and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) // *Biological Control*. V. 32. P. 427–441. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.12.012>
- Hoy M.A., Jeyaprakash A., 2008. Symbionts, including pathogens, of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*: current and future analysis methods // *Experimental and Applied Acarology*. V. 46. P. 329–347. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9185-3>
- Johanowicz D.L., Hoy M.A., 1996. *Wolbachia* in a Predator–Prey System: 16S Ribosomal DNA Analysis of Two Phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and Their Prey (Acari: Tetranychidae) // *Annals of the Entomological Society of America*. V. 89. P. 435–441. <https://doi.org/10.1093/aesa/89.3.435>
- Kim D., Song L., Breitwieser F.P., Salzberg S.L., 2016. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences // *Genome Research*. V. 12. P. 1721–1729. <https://doi.org/10.1101/gr.210641.116>
- Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M., 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation // *Genome Research*. V. 27. P. 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Manni M., Berkeley M.R., Seppey M., Simao F.A., Zdobnov E.M., 2021. BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes // *Molecular Biology and Evolution*. V. 38. P. 4647–4654. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab199>
- Merlin B.L., Moraes G.J., Cônsoli F.L., 2023. The Microbiota of a Mite Prey-Predator System on Different Host Plants Are Characterized by Dysbiosis and Potential Functional Redundancy // *Microbial Ecology*. V. 85. P. 1590–1607. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02032-6>
- Ondov B.D., Bergman N.H., Phillippy A.M., 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser // *BMC Bioinformatics*. V. 12. P. 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Pekas A., Palevsky E., Sumner J.C. et al., 2017. Comparison of bacterial microbiota of the predatory mite *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) and its factitious prey *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) // *Scientific Reports*. V. 7. P. Article № 2. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00046-6>
- Rozas-Serri M., Lobos C., Correa R., et al., 2020. Atlantic Salmon Pre-smolt Survivors of *Renibacterium salmoninarum* Infection Show Inhibited Cell-Mediated Adaptive Immune Response and a Higher Risk of Death During the Late Stage of Infection at Lower Water Temperatures // *Frontiers in Immunology*. V. 11. Article № 13787. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01378>
- Sanchez N.E., Greco N.M., Cedola C.V., 2008. Biological Control by *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae). In: Capinera J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Dordrecht: Springer. P. 493–495. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_319
- Schütte C., Gols R., Kleespies R.G., Poitevin O., Dicke M., 2008. Novel bacterial pathogen *Acaricomes phytoseiuli* causes severe disease symptoms and histopathological changes in the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari, Phytoseiidae) // *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 2. P. 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.006>
- Sonoda S., Kohara Y., Sizingerile, Toyoshima S., Kishimoto H., Hinomoto N., 2012. Phytoseiid mite species composition in Japanese peach orchards estimated using quantitative sequencing // *Experimental and Applied Acarology*. V. 56. № 1. P. 9–22. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9485-x>
- Stanke M., Keller O., Gunduz I., Hayes A., Waack S., Morgenstern B., 2006. AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts. *Nucleic Acids Research*. V. 34. № 2. P. 435–439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl200>
- Sumner-Kalkun J.C., Baxter I., Perotti M.A., 2023. Bacterial microbiota of three commercially mass-reared predatory mite species (Mesostigmata: Phytoseiidae): pathogenic and beneficial interactions // *Frontiers in Arachnid Science*. V. 2. Article № 1242716. <https://doi.org/10.3389/frchs.2023.1242716>
- Weeks A.R., Velten R., Stouthamer R., 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods // *Proceedings of the Royal Society B.V.* 270. P. 1857–1865. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2425>
- Wu K., Hoy M.A., 2012. *Cardinium* is associated with reproductive incompatibility in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) // *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 110. P. 359–365.
- Yang W., Yi Y., Xia Bo, 2023. Unveiling the duality of *Pantoea dispersa*: A mini review // *Science of The Total Environment*. V. 873. Article № 162320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162320>

METAGENOMIC ANALYSIS OF THE MICROBIOTA OF A LABORATORY MITE POPULATION OF *NEOSEIULUS CALIFORNICUS* (MESOSTIGMATA, PHYTOSEIIDAE) AND THE OPTIMISATION OF MICROBIOTA COMPOSITION TO IMPROVE MITE BREEDING EFFICIENCY

B.V. Andrianov^{1,*}, L.A. Uroshlev^{1,}, O.V. Vasilenko^{2,***}, Y.I. Meshkov^{3,****}**

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

² All-Russia Collection of Microorganisms, G.K. Skryabin Institute of the Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

³ All-Russia Scientific Research Institute of Phytopathology, Moscow Oblast, Odintsovsky District, Bolshiye Vyazyomy, 143050 Russia

* e-mail: andrianovb@mail.ru

** e-mail: leoniduroshlev@gmail.com

*** e-mail: ovvasilenko@gmail.com

**** e-mail: yimeshkov@rambler.ru

Experimental modelling of the microbiota of a biocontrol population of the predatory mite, *Neoseiulus californicus* bred on the spider mite, *Tetranychus urticae* was carried out to both eliminate bacterial pathogens and increase the viability of the mite line. We produced an isofemale line of *N. californicus* BioDefence2 and a derived line with an optimised microbiota BioDefence3. The microbiota was optimised by a sequential treatment of the mite line with tetracycline to eliminate pathogenic bacteria, followed by a treatment with the probiotic bacterium, *Bacillus subtilis* to restore the viability of the mite line. The microbiotas of the BioDefence2 and BioDefence3 mite lines were compared using metagenomic 16S rRNA gene data. The metagenomic data were extracted from the hologenomes of the mite lines obtained through Oxford Nanopore long read sequencing. The bacterial species comprising the microbiotas of the original and optimised mite lines were identified. The saprophytic soil bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter johnsonii* and *Enterobacter hormaechei*, also known as opportunistic human pathogens, form the basis of the *N. californicus* microbiota. The optimization of the microbiota eliminates the intracellular bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, a well-known fish pathogen. The effect of mite microbiota optimisation on the viability of the biocontrol population of *N. californicus* is discussed. The results obtained may provide a basis for improving the technology of *N. californicus* rearing.

Keywords: Phytoseiidae, microbiota, probiotic bacteria, 16S rRNA gene, metabarcoding