

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.61

EDN: NPXLVY

DOI: 10.21285/achb.982



Поиск и анализ разнообразия структур CRISPR-Cas-систем патогенных штаммов *Clostridium botulinum* с целью создания экологически безопасных фаговых препаратов

Г.А. Тетерина*,[✉] В.П. Соловарова*, Ю.П. Джиоев**, Н.А. Арефьева***,****,
А.Ю. Борисенко**, Ю.С. Букин*****, С.В. Эрдынеев******, Л.А. Степаненко**,
Д.А. Антипин**, К.Б. Кахиани**, А.Э. Макарова**

*Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация

***Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека,

Иркутск, Российская Федерация

****Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока,

Иркутск, Российская Федерация

*****Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. В работе представлено биоинформационное исследование разнообразия CRISPR-Cas-систем в геномах *Clostridium botulinum* и детектируемых ими фагов с перспективной целью их таргетного скрининга. Объектом исследования стали 49 полных хромосомных последовательностей бактерий, взятых из базы данных GenBank. Для идентификации cas-генов использовался программный комплекс MacSyFinder с применением профилей HMM из баз данных PFAM и TIGRFAM. Поиск и анализ CRISPR-кассет осуществлялся с помощью трех независимых программ: CRISPRFinder, PILER-CR и CRISPR Recognition Tool, что обеспечило высокую точность определения структуры кассет. Поиск протоспайсеров проводился с использованием программы CRISPRTarget и алгоритма BLASTn против вирусных баз данных RefSeq-Viral. Исследование включало сопоставление последовательностей спайсеров с геномами фагов для выявления комплементарных участков. Анализ фагового иммунитета показал преобладание фагов *Cellulophaga* (19%), что связано с экологическими особенностями *Clostridium botulinum*, а также значительную долю фагов *Aeromonas* и *Bacillus* (12,5%). Следующую группу фагов, преимущественно направленных на кишечную микрофлору, составили виды *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus* (6–10%). Найдены протоспайсеры редких фагов (по 3%): *Acidiainus filamentous*, *Prochlorococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Stenotrophomonas*, *Synechococcus*. Полученные результаты указывают на сложную структуру CRISPR-Cas-систем *Clostridium botulinum*, эволюционно формирующихся под влиянием различных экологических ниш.

Ключевые слова: *Clostridium botulinum*, фаговые препараты, CRISPR-Cas-система, биоинформационные алгоритмы, фаги

Для цитирования: Тетерина Г.А., Соловарова В.П., Джиоев Ю.П., Арефьева Н.А., Борисенко А.Ю., Букин Ю.С. [и др.]. Поиск и анализ разнообразия структур CRISPR-Cas-систем патогенных штаммов *Clostridium botulinum* с целью создания экологически безопасных фаговых препаратов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. № 2. С. 224–233. DOI: 10.21285/achb.982. EDN: NPXLVY.

Identification and diversity analysis of CRISPR-Cas systems in the pathogenic strains of *Clostridium botulinum* to create eco-friendly phage preparations

Galina A. Teterina*, Valentina P. Salovarova*, Yuri P. Dzhioev**,
Nadezhda A. Arefieva***, Andrey Yu. Borisenko**, Yuri S. Bukin****,
Sergey V. Erdyneev****, Liliya A. Stepanenko**, Dmitry A. Antipin**,
Kristina B. Kakhiani**, Angeina E. Makarova**

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

***Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

****Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russian Federation

*****Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The article presents a bioinformatic study of the diversity of CRISPR-Cas systems in the genomes of *Clostridium botulinum* and the phages they detect, with the aim of their targeted screening. The subject matter of the study was 49 complete chromosomal sequences of bacteria obtained from the GenBank database. Cas genes were identified employing the MacSyFinder tool with the use of HMM profiles from the PFAM and TIGRFAM databases. The identification and analysis of CRISPR cassettes were performed using three independent programs: CRISPRFinder, PILER-CR, and CRISPR Recognition Tool, which ensured high accuracy in determining the cassette structure. Protospacers were identified using the CRISPRTarget tool and the BLASTn algorithm against RefSeq-Viral viral databases. The study involved comparing spacer sequences and phage genomes in order to identify complementary sites. A phage immunity analysis revealed a predominance of Cellulophaga phages (19%), which can be attributed to the environmental characteristics of *Clostridium botulinum*, as well as a significant proportion of *Aeromonas* and *Bacillus* phages (12.5%). Another group of phages (predominantly intestinal) included *Enterococcus*, *Escherichia*, and *Lactococcus* species (6–10%). Also, the protospacers of rare phages (3% each) were found: *Acidianus filamentous*, *Prochlorococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Stenotrophomonas*, and *Synechococcus*. The obtained results indicate complex CRISPR-Cas systems in *Clostridium botulinum*, evolving under the impact of different ecological niches.

Keywords: *Clostridium botulinum*, phage preparations, CRISPR-Cas system, bioinformatic algorithms, phages

For citation: Teterina G.A., Salovarova V.P., Dzhioev Yu.P., Arefieva N.A., Borisenko A.Yu., Bukin Yu.S., et al. Identification and diversity analysis of CRISPR-Cas systems in the pathogenic strains of *Clostridium botulinum* to create eco-friendly phage preparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(2).224-233. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.982. EDN: NPXLVY.

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине остается актуальной проблема инфекций, вызываемых *Clostridium botulinum* – анаэробной грамположительной палочкой, образующей устойчивые к физическим факторам споры и широко распространенной в природе. Данные бактерии являются возбудителями ботулизма – тяжелой пищевой токсико-инфекции, вызываемой ботуническим токсином и характеризуемой глубоким поражением нервной системы. Ботунические нейротоксины (*botulinum neurotoxin*, BoNT) – это белковые токсины, которые распределены по нескольким группам грамположительных облигатно анаэробных бактерий вида *C. botulinum*. Определены четыре генетически различные бактериальные группы *C. botulinum* (I–IV). В то же время семь различных серо-

типов синтезируемых белковых нейротоксинов (типы A–G) включают: группу I (протеолитические, продуцирующие нейротоксины A, B и F), группу II (непротеолитические, продуцирующие нейротоксины B, E и F), группу III (продуцирующие нейротоксины C и D) и группу IV (продуцирующие нейротоксин G). Нейротоксины типов A, B, E и иногда F в основном связаны с ботулизмом у людей. Гены данных нейротоксинов могут встречаться как в конъюгативных плазмidaх, так и в хромосомно интегрированных островах патогенности *C. botulinum* [1–6]. BoNT, вырабатываемые *C. botulinum*, поражают двигательные нейроны и подавляют высвобождение ацетилхолина, что приводит к нервно-мышечной блокаде. Вызываемое BoNT заболевание – ботулизм – без лечения часто заканчивается летальным исходом. Наиболее рас-

пространенной формой ботулизма у взрослых является пищевой ботулизм, который возникает в результате приема предварительно сформированного BoNT в консервированных продуктах. Еще более опасен детский ботулизм, возникающий у детей и младенцев, который отличается от пищевого ботулизма тем, что вызывается не употреблением готового токсина, а развитием в кишечнике бактерий *C. botulinum*, которые производят токсин. Данная форма заболевания требует лечения, направленного на подавление роста возбудителя *C. botulinum* [2, 4, 6].

Природный штамм *C. botulinum* G1 является причиной значительной части случаев пищевого ботулизма и зафиксирован как основной источник детского ботулизма из-за колонизации их кишечника бактериями, производящими BoNT, остается множество вопросов относительно средств и ограничительных барьера для горизонтального переноса кластера генов BoNT у этого вида. Было проведено исследование, в ходе которого плазмида pCLJ, несущая ген BoNT G1 *C. botulinum*, была экспериментально перенесена посредством конъюгации в виды *C. sporogenes*, *C. butyricum* и G3 *C. botulinum*, что засвидетельствовало возможность межвидового и внутривидового переноса плазмид. В то же время плазмиды являются основным мобильным генетическим элементом, связанным с BoNT, у большинства видов BoNT (+) фаг несет гены BoNT/C и D в G3 *C. botulinum*. Было выявлено, что гены BoNT/C и D в G3 *C. botulinum* находятся в области профага, которая была экспериментально удалена. Показано, что ввиду их отсутствия устранилась токсичность штамма. Подобная динамика не наблюдалась в других группах видов. Хотя профаги редко обнаруживались вблизи определенных мест вставки BoNT в нескольких штаммах G1 *C. botulinum*, в настоящее время нет дополнительных доказательств, которые указывали бы на фаг как на движущую силу распространения фактора вирулентности BoNT в G1 *C. botulinum* или *C. sporogenes* [6, 7].

При колонизации *C. botulinum* кишечника человека без незамедлительного и эффективного лечения возникает высокая вероятность летального исхода – до 80%. Антибиотикотерапия из-за множественной устойчивости бактерии становится неэффективной и является причиной возникновения новых высокопатогенных форм бактерий, что влияет на исход успешного выздоровления. В связи с этим, чтобы вернуть прежние позиции в области антибактериальной терапии в отношении клоstrидий, необходимы новые экологически безопасные подходы к поиску и созданию эффективных способов и технологий борьбы с данными патогенными микроорганизмами. На сегодняшний день основным специфическим лечением при ботулизме является внутривенное введение гетерологической (лошадиной) противоботулинической сыворотки типов A, B, E в максимально короткие сроки после появления симптомов. Антитоксин входит в стандарт лечения при ботулинической инфекции и имеет доказанную эффективность. Тем не менее восстановление нарушенных в результате отравления нейротоксином функций занимает длительное время, что подтверждается свидетельствами заболевших [3, 8].

Одним из способов лечения бактериальных инфекций является терапия фагами, нейтрализующими соответствующий патогенный вид бактерий. Разработка безо-

пасных препаратов фаговой терапии на первом своем этапе включает биоинформационное изучении системы «адаптивного иммунитета» бактерий CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). CRISPR-Cas защищает бактерии от внедрения чужеродных генетических элементов путем нацеливания на участки их генома комплементарных фрагментов нуклеиновых кислот. CRISPR-локус представляет собой набор коротких палиндромных нуклеотидных повторов, разделенных спайсерами – участками ДНК или РНК фагов. Локус, содержащий перемежающиеся спайсерами повторы, далее экспрессируется в малую направляющую РНК CRISPR (crRNA), которая направляет фермент Cas9 к определенной последовательности ДНК фагов или плазмид для их расщепления. Основанная на белках Cas-система CRISPR-Cas классифицируется в соответствии с принятой системой классификации и подразделяется на два класса: класс 1 – эффекторный комплекс, образованный несколькими белками Cas; класс 2, в котором эффектором является один большой многодоменный белок. Классы систем CRISPR/Cas подразделяются на несколько типов, которые состоят из отдельных адаптационных и эффекторных модулей [7, 9–14]. В настоящее время CRISPR-Cas-системы нашли широкое применение в биоинженерии и биотехнологии для редактирования геномов эмбрионов растений и животных, в области терапии рака, они также применяются в качестве противомикробного средства против патогенных бактерий и даже для борьбы с новым коронавирусом SARS-CoV-2 [8, 15–18]. CRISPR-Cas-системы в роли адаптивных иммунных модулей хозяина могут использоваться для получения прямого представления о событиях горизонтального переноса генов, в том числе генов патогенности между различными штаммами и видами бактерий [19–23].

К сожалению, на сегодняшний день существует очень мало исследований о спектрах бактериофагов, к которым могут быть адаптированы различные штаммы *C. botulinum*. Получение этой информации напрямую при посевах *C. botulinum* и заражении колоний различными видами фагов затруднительно в связи с высокой патогенностью анаэробной бактерии и сложностью работы с ней в лабораториях. Другим способом получения информации о спектрах вирусов, к которым устойчива *C. Botulinum*, может являться биоинформационный анализ по поиску в полногеномных данных CRISPR-Cas-систем, а также анализ сходства спайсеров (протоспайсеров) в этих системах с фрагментами геномов различных бактериофагов. Анализ CRISPR-Cas-систем *C. botulinum* с помощью методов биоинформатики на предварительном этапе скрининга позволит избежать случаев внутрилабораторного заражения при культивировании бактерий, а также сократит время для получения эффективных препаратов фаговой терапии, нацеленных только на патогенный возбудитель ботулизма [24].

В связи с вышеуказанным целью проведенного исследования явилось осуществление биоинформационического анализа разнообразия CRISPR-Cas-систем в геномах *C. botulinum* и определение спектров детектируемых ими фагов с перспективой их таргетного скрининга против данных патогенов на основе полногеномных данных базы GenBank.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования стали полногеномные последовательности *C. Botulinum*, выбранные из базы данных GenBank. Для анализа были взяты только 49 геномов, собранных до полной кольцевой хромосомы (табл. 1). Для всех 49 геномов была проведена реаннотация белок-кодирующих генов с помощью онлайн-приложения GeneMarks 4.28¹.

Таблица 1. Проанализированные геномы с номерами базы GenBank

Table 1. Analyzed genomes with GenBank base numbers

Геном <i>Clostridium botulinum</i> NCBI ID	Подтип CRISPR-Cas	Количество спейсеров
CP013296.1	-	9
CP013681.1	-	9
CP063816.1	I-B	81
CP010520.1	-	17
CP010521.1	-	17
CP001078.1	-	18
CP000727.1	III-B	20
FR745875.1	-	15
CP001056.1	-	15
CP013707.1	-	3
CP028842.1	III-B	20
CP000726.1	III-B	20
CP013247.1	-	3
CP006903.1	-	1
CP046450.1	III-B	19
AM412317.1	III-B	19
CP006907.1	III-D	15
AP014696.1	I-B	72
CP013841.1	I-B	18
CP059677.1	-	18
CP013849.1	-	5
FR773526.1	III-B	25
CP028859.1	I-B	73
CP013845.1	-	4
CP031097.1	III-B	18
CP013683.1	I-B	15
CP014151.1	-	21
CP013843.1	III-B	36
CP014148.1	-	17
CP031098.1	-	18
CP013686.1	III-A	8
CP000939.1	III-D	18
CP014219.1	-	4
CP001083.1	III-B	18
CP027780.1	-	
CP000962.1	-	3
CP002011.1	III-B	26
CP013705.1	-	5

CP000728.1	III-B	26
CP027779.1	III-B	131
CP027781.1	III-B	131
CP014174.1	III-A	7
CP013850.1	III-A	27
CP006902.1	-	18
CP013246.1	I-B	22
CP006908.1	III-B	17
CP013847.1	-	21
CP001581.1	-	24

Идентификация cas-генов среди предсказанных рамок считывания проводилась с помощью онлайн-приложений MacSyFinder², PILER-CR³, CRISPR Recognition Tool⁴. Результаты поиска Cas по всем вышеперечисленным приложениям объединены в единый массив данных. По расположению в геноме Cas-генов были идентифицированы нуклеотидные последовательности протоспайсеров – участков чужеродной ДНК или РНК, которые распознаются и разрезаются системой CRISPR-Cas для защиты от бактериофагов.

Идентификация принадлежности протоспайсеров к определенным таксонам бактериофагов была проведена с помощью программы CRISPRTarget⁵, использующей алгоритм парного выравнивания BLASTn против вирусных баз данных RefSeq-Viral (13528 последовательностей).

В каждом из 49 исследованных геномов были обнаружены Cas-гены и CRISPR-Cas-системы. Все выявленные кластеры генов cas принадлежат к классу I и относятся преимущественно к типу III (20/27) генов, которые используются иммунной системой бактерий для обеспечения противовирусного иммунитета через двойной механизм разрушения РНК и ДНК. В большинстве CRISPR-Cas-кассет один и тот же консенсусный повтор – TAAATACATCTCATGTTAAC (рис. 1). Данный повтор по структуре нуклеотидной последовательности принадлежит к суперклассу A, который, в свою очередь, встречается у различных видов бактерий и архей. Наличие такого повтора, переназначение которого заключается в совместном участии вместе с другими компонентами системы, такими как crRNA (CRISPR РНК) и Cas-белки, в разрушении чужеродного генетического материала, свидетельствует о том, что в естественной среде *C. botulinum* действительно контактирует с различными бактериофагами, участвующими в регуляции ее численности.

Количество участков, кодирующих протоспайсеры, в исследованных штаммах *C. botulinum* варьировало от 1 до 13 (см. табл. 1). Всего было выделено 204 варианта различных протоспайсеров.

Из всего разнообразия протоспайсеров потенциальные мишени – бактериофаги – были идентифицированы для 37 протоспайсеров (табл. 2). По принадлежности к потенциальным хозяевам идентифицированные бактериофаги могут паразитировать на

¹ GeneMarkS // Exon.gatech.edu. Режим доступа: <https://exon.gatech.edu/genemark.cgi> (дата обращения: 04.07.2024).

² MacSyFinder // Github.com. Режим доступа: <https://github.com/gem-pasteur/macsyfinder> (дата обращения: 04.07.2024).

³ PILER-CR // Drive5.com. Режим доступа: <https://www.drive5.com/piler/> (дата обращения: 22.01.2025).

⁴ CRISPR Recognition Tool // Room220.com. Режим доступа: <http://www.room220.com/crt/> (дата обращения: 04.07.2024).

⁵ CRISPRTarget // Crispr.otago.ac.nz. Режим доступа: https://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html (дата обращения: 04.07.2024).

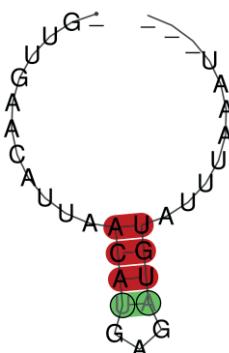


Рис. 1. Реконструированная вторичная структура консенсусного повтора CRISPR-Cas *Clostridium botulinum*

Fig. 1. Reconstructed secondary structure of the *Clostridium botulinum* consensus CRISPR-Cas repeat

представителях 14 различных родов бактерий (рис. 2), среди которых доминировали *Cellulophaga*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Citobacte*.

Самой многочисленной группой возбудителей оказались бактериофаги бактерий рода *Cellulophaga* (19%), обитающих в морских водорослях. Вторыми по численности стали виды фагов, поражающих бактерии родов *Aeromonas* и *Bacillus phage* (12,5%). Бактерии рода *Aeromonas* обитают в воде и могут выступать еще и в роли патогена для человека. Бактерии рода *Bacillus* входят в состав здоровой микробиоты желудочно-ки-

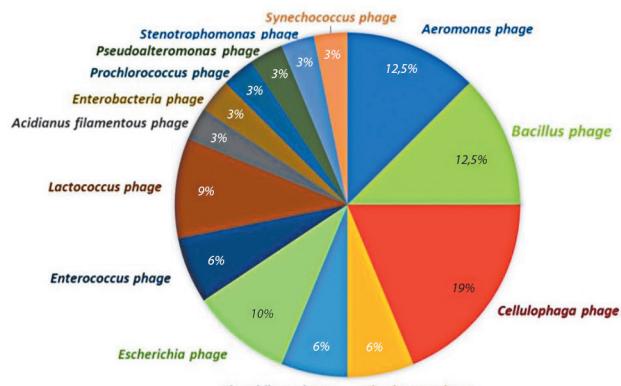


Рис. 2. Спектр фагов (на уровне рода поражаемых бактерий), фрагменты геномов которых были идентифицированы среди протоспайсеров выборки из 49 геномов *Clostridium botulinum*

Fig. 2. Phage spectrum (at the level of the genus of bacteria affected) whose genome fragments have been identified among the protospacers of a sample of 49 *Clostridium botulinum* genomes

шечного тракта человека и животных. Третью группу составили фаги, поражающие бактерии родов *Clostridium*, *Enterococcus* (6%), *Escherichia* (10%), *Lactococcus* (9%). Отличительной чертой данной группы является преимущественное количество (3/4) фагов, направленных на полезные бактерии желудочно-кишечного тракта человека. Четвертая группа представлена одним видом

Таблица 2. Протоспейсеры, для которых были идентифицированы бактериофаги

Table 2. Protospacers for which bacteriophages have been identified

Идентификатор в NCBI RefSeq	Фаг	Длина протоспайсера	Последовательность спайсера
NC_001629.1	<i>Lactococcus</i> phage bIL67	20	GCAGCTATATAACAACTAATCGAAAAGGATAT
NC_028671.1	<i>Enterococcus</i> phage vB_EfaS_IME197	20	TTCAAACACTCCTTAATTAGAAAAGGAGAAATAAT
NC_029094.1	<i>Pseudoalteromonas</i> phage H101	20	GATAAACAGAAGAAGCTATGATGTTGCTACAAAC
NC_015262.1	<i>Clostridium</i> phage phiCD6356	36	AATAGAGTATTCAAGATGAATATAAATTCTTGGAGA
NC_021788.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi4:1	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGAGATTAGA
NC_021798.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi17:2	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGAGATTAGA
NC_008265.1	<i>Clostridium</i> phage phiSM101	20	ATTTTCATAATGTTTAATGTTAGTAATTACTATTTG
NC_021789.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi19:3	21	TCATCAATTTCATACCATCAAATTGATTATTGTC
NC_021799.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi19:1	21	TCATCAATTTCATACCATCAAATTGATTATTGTC
NC_015262.1	<i>Clostridium</i> phage phiCD6356	36	AATAGAGTATTCAAGATGAATATAAATTCTTGGAGA
NC_021788.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi4:1	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGAGATTAGA
NC_021798.1	<i>Cellulophaga</i> phage phi17:2	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGAGATTAGA
NC_006883.2	<i>Prochlorococcus</i> phage P-SSM2	31	TACAAATCAAAAGAAATTGATTAAATCAAATAAA
NC_010537.1	<i>Acidianus</i> filamentous virus 9	25	GCGTCCTTATCTTCTACTCCACACAAGTTCCCTT
NC_028826.1	<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm5	20	TTTTATTATAAAATAGAA
NC_008208.1	<i>Aeromonas</i> virus 25	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTAAAAATTAA
NC_012663.1	<i>Lactococcus</i> phage P087	20	CGGAATTCCCTTGGAGATAAAAGGATTGAAACCTC
NC_014635.1	<i>Aeromonas</i> phage phiAS4	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTAAAAATTAA
NC_019543.1	<i>Aeromonas</i> phage Aes508	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTAAAAATTAA
NC_020879.1	<i>Aeromonas</i> phage Aes012	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTAAAAATTAA
NC_021861.1	<i>Lactococcus</i> phage BM13	24	GCTTTATAATGCTTAATGTTTAGTTCTTC
NC_025447.1	<i>Escherichia</i> phage 121Q	20	TAAAGAAGAATGTAAAAAAATGTAAATGCAAATATTG
NC_027364.1	<i>Escherichia</i> phage PBECO 4	20	TAAAGAAGAATGTAAAAAAATGTAAATGCAAATATTG

фагов *Citrobacter phage* (6%) – его действие направлено на бактерии рода *Citrobacter*, некоторые виды которого обитают в кишечнике человека, являясь представителями условно-патогенной микробиоты. Пятая группа представлена одиночными соотвествиями фагов, на каждый из которых приходится 3% встречаемости. В состав данной группы входят *Acidianus filamentous phage*, *Prochlorococcus phage*, *Pseudoalteromonas phage*, *Stenotrophomonas phage*, *Synechococcus phage*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате анализа разнообразия протоспейсеров в 49 полных геномах исследованных штаммов *C. botulinum* было установлено, что бактерии данной группы могли потенциально инфицироваться различными группами бактериофагов, близкие родственники которых инфицируют бактерии, обитающие в различных природных средах. Все бактерии-носители этих бактериофагов можно поделить на три большие группы: 1 – бактерии в естественных условиях обитания (бактерии, ассоциированные с природной средой, почвой, водой, растениями); 2 – бактерии-симбионты человека и условно-патогенная микробиота человека; 3 – патогенные бактерии и условно патогенные для человека бактерии, которые могут обитать в окружающей среде (смешанная группа). В связи с этим места приобретения иммунитета у *C. botulinum* к различным бактериофагам также можно поделить на три группы 1 – в естественных условиях обитания; 2 – при заражении человека; 3 – смешанная группа, которая выступает в качестве условных патогенов или также обитает в естественных условиях (рис. 3).

Как уже упоминалось ранее, в некоторых полных геномах *C. botulinum* было обнаружено от 10 до 13 протоспейсеров. В геномах штаммов CP027779.1 и CP027781.1 было идентифицировано 13 протоспейсеров. Данный штамм был изолирован в мае 2004 г. на рыбном рынке в городе Kochin штата Карела Индии. Для штамма CP028859.1, содержащего 10 протоспейсеров, в аннотации полного генома указано, что данный номер относится к полному геному штамма CFSAN064329, поддерживаемого и культивируемого лабораторией Управления по контролю за продуктами и лекарствами (англ.: Food and Drug Administration) США, исходное происхождение штамма неизвестно. Штамм AP014696.1, содержащий 9 протоспейсеров, был изолирован в процессе анализа при семейной вспышке ботулизма в префектуре Ишикава Японии в 1995 г. Для штамма CP002011.1, содержащего 8 протоспейсеров, в аннотации полного генома указано, что данный номер

- По месту обитания в природе
- При заражении человека
- Смешанная

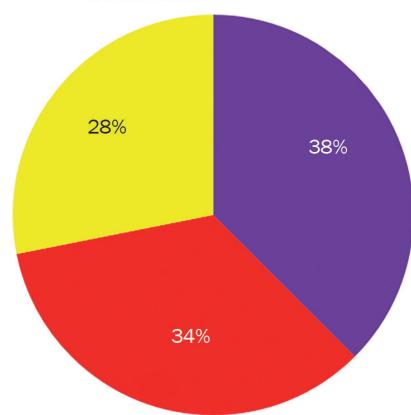


Рис. 3. Соотношение потенциальных мест приобретения иммунитета к фагам штаммов *Clostridium botulinum*, полученное на основе анализа характеристик близкородственных к протоспейсерам вирусов

Fig. 3. Ratios of potential sites of immunity acquisition to phages of *Clostridium botulinum* strains based on the characteristics of viruses closely related to protospacers

относится к полному геному штамма F str. 230613, изолированного в Китае в период до 2010 г. Из описания наиболее устойчивых штаммов видов следует, что они могут быть изолированы в различных регионах мира с преимущественно теплым климатом как от человека при вспышке забивания, так и из окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования бактерий *C. botulinum* с помощью биоинформационных методов в геномах 49 штаммов были обнаружены полные CRISPR-Cas-системы и CRISPR-кассеты. Количество протоспейсеров, отвечающих за устойчивость к фагам, варьировало от 1 до 13. Из общего количества 204 протоспейсеров для 33 были идентифицированы бактериофаги со схожими участками геномной последовательности. По своей природе идентифицированные бактериофаги поражают различные виды бактерий, обитающих в контрастных природных условиях, либо бактерии, ассоциированные с организмом человека. Полученный таким образом спектр бактериофагов можно исключить из потенциальных кандидатов для проведения терапии против *C. botulinum*.

REFERENCES

1. Hill K.K., Smith T.J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. In: Rummel A., Binz T. (eds). *Botulinum Neurotoxins. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin: Springer; 2012, vol. 364, p. 1-20. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9_1.
2. Zhang S., Masuyer G., Zhang J., Shen Y., Lundin D., Henriksson L., et al. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nature Communication*. 2017;14130. DOI: 10.1038/ncomms14130.
3. Bowe B.K., Wentz T.G., Gregg B.M., Tepp W.H., Schill K.M., Sharma S., et al. Genomic diversity, competition, and toxin production by group I and II *Clostridium botulinum* strains used in food challenge studies. *Microorganisms*. 2022;10(10):1895. DOI: 10.3390/microorganisms10101895.
4. Carter A.T., Peck M.W. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* group I and group II. *Research in Microbiology*. 2015;166(4):303-317. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010.
5. Brunt J., van Vliet A.H.M., Stringer S.C., Carter A.T., Lindström M., Peck M.W. Pan-genomic analysis of *Clostridium botulinum* strains. *Microbiology*. 2017;163(11):1653-1664. DOI: 10.1099/mic.0.10530.

tridium *botulinum* group II (non-proteolytic *C. botulinum*) associated with foodborne botulism and isolated from the environment. *Toxins.* 2020;12(5):306. DOI: 10.3390/toxins12050306.

6. Smith T.J., Williamson C.H.D., Hill K.K., Johnson S.L., Xie G., Anniballi F., et al. The distinctive evolution of *orfX Clostridium parabotulinum* strains and their botulinum neurotoxin type A and F gene clusters is influenced by environmental factors and gene interactions via mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology.* 2021;12:566908. DOI: 10.3389/fmicb.2021.566908.

7. Nawrocki E.M., Bradshaw M., Johnson E.A. Botulinum neurotoxin-encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. *Scientific Reports.* 2018;8:3100. DOI: 10.1038/s41598-018-21342-9.

8. Yang L., Ning Q., Tang S.-S. Recent advances and next breakthrough in immunotherapy for cancer treatment. *Journal of Immunology Research.* 2022;8052212. DOI: 10.1155/2022/8052212.

9. Alkhnbashi O.S., Meier T., Mitrofanov A., Backofen R., Vob B. CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods.* 2020;172:3-11. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.013.

10. Butiuc-Keul A., Farkas A., Carpa R., Iordache D. CRISPR-Cas system: the powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes. *Microbial Physiology.* 2022;32(1-2):2-17. DOI: 10.1159/000516643.

11. Tang Y., Gao L., Feng W., Guo C., Yang Q., Li F., et al. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development. *Chemical Society Reviews.* 2021;50(21):11844-11869. DOI: 10.1039/D1CS00098E.

12. Koonin E.V., Makarova K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophic Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences.* 2019;374(1772):20180087. DOI: 10.1098/rstb.2018.0087.

13. Koonin E.V., Makarova K.S. Mobile genetic elements and evolution of crispr-cas systems: all the way there and back. *Genome Biology and Evolution.* 2017;9(10):2812-2825. DOI: 10.1093/gbe/evx192.

14. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology.* 2017;37:67-78. DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

15. Bhatia S., Pooja, Yadav S.K. CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2023;238:124054. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124054.

16. Chen C., Wang Z., Qin Y. CRISPR/Cas9 system: recent applications in immuno-oncology and cancer immunotherapy. *Experimental Hematology and Oncology.* 2023;12(1):95. DOI: 10.1186/s40164-023-00457-4.

17. Bhokisham N., Laundermilch E., Traeger L.L., Bonilla T.D., Ruiz-Estevez M., Becker J.R. CRISPR-Cas system: the current and emerging translational landscape. *Cells.* 2023;12(8):1103. DOI: 10.3390/cells12081103.

18. Huang S., Dai R., Zhang Z., Zhang H., Zhang M., Li Z., et al. CRISPR/Cas-based techniques for live-cell imaging and bioanalysis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(17):13447. DOI: 10.3390/ijms241713447.

19. Van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology.* 2014;12(7):479-492. DOI: 10.1038/nrmicro3279.

20. Behler J., Hess W.R. Approaches to study CRISPR RNA biogenesis and the key players involved. *Methods.* 2020;172:12-26. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.015.

21. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology.* 2015;13:722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.

22. Pursey E., Dimitriu T., Paganelli F.L., Westra E.R., van Houte S. CRISPR-Cas is associated with fewer antibiotic resistance genes in bacterial pathogens. *Philosophic Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences.* 2022;377:20200464. DOI: 10.1098/rstb.2020.0464.

23. Negahdaripour M., Nezafat N., Hajighahramani N., Rahmatabadi S.S., Ghasemi Y. Investigating CRISPR-Cas systems in *Clostridium botulinum* via bioinformatics tools. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017;54:355-373. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.027.

24. Wentz T.G., Tremblay B.J.M., Bradshaw M., Doxey A.C., Sharma S.K., Sauer J.-D., et al. Endogenous CRISPR-Cas systems in group I *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* do not directly target the botulinum neurotoxin gene cluster. *Frontiers in Microbiology.* 2022;12:787726. DOI: 10.3389/fmicb.2021.787726.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Тетерина Галина Александровна,
аспирант,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ galina.teterina.91@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-0487-8223>

Саловарова Валентина Петровна,
д.б.н., профессор, заведующий кафедрой,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ vsalovarova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Galina A. Teterina,
Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ galina.teterina.91@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-0487-8223>

Valentina P. Salovarova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ vsalovarova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>

Джииоев Юрий Павлович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
alanir07@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Арефьева Надежда Александровна,
аспирант,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
младший научный сотрудник,
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
arefieva.n4@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2222-4518>

Борисенко Андрей Юрьевич,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
89500720225@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Букин Юрий Сергеевич,
к.б.н.,
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН,
664003, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3,
Российская Федерация,
bukin.yura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

Эрдынеев Сергей Викторович,
аспирант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
младший научный сотрудник,
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока,
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78,
Российская Федерация,
orry230@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0006-7937-1382>

Yuri P. Dzhioev,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
alanir07@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Nadezhda A. Arefieva,
Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Clinical Research Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya, St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Junior Researcher,
Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems,
16, Timiryazev St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
arefieva.n4@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2222-4518>

Andrey Y. Borisenko,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
89500720225@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Yuri S. Bukin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Senior Researcher,
Limnological Institute, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
3, Ulanbatorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
bukin.yura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

Sergey V. Erdyneev,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation;
Junior Researcher,
Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute
of Siberia and the Far East,
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,
Russian Federation,
orry230@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0006-7937-1382>

Степаненко Лилия Александровна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
steplia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Антипин Дмитрий Андреевич,
аспирант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
mieshamecka@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-9442-9907>

Кахиани Кристина Бесиковна,
лаборант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
kagkkris12@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0000-7901-7056>

Макарова Ангелина Эдуардовна,
лаборант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
eamak18@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-2207-5668>

Вклад авторов

Г.А. Тетерина – проведение исследования, написание черновика рукописи, визуализация.
В.П. Саловарова – административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, редактирование рукописи.
Ю.П. Джоев – разработка концепции, научное руководство, предоставление ресурсов, курирование данных, формальный анализ.
Н.А. Арефьева – разработка программного обеспечения, валидация результатов.
А.Ю. Борисенко – разработка методологии, проведение исследования.
Ю.С. Букин – предоставление ресурсов, научное руководство, разработка программного обеспечения, валидация результатов, редактирование рукописи.
С.В. Эрдынеев – проведение исследования, визуализация.
Л.А. Степаненко – проведение исследования, предоставление ресурсов, курирование данных, формальный анализ.
Д.А. Антипин – проведение исследования.
К.Б. Кахиани – проведение исследования.
А.Э. Макарова – проведение исследования.

Liliya A. Stepanenko,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
steplia@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Dmitry A. Antipin,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
mieshamecka@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-9442-9907>

Kristina B. Kakhiani,
Laboratory Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kagkkris12@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0000-7901-7056>

Angelina E. Makarova,
Laboratory Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
eamak18@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-2207-5668>

Contribution of the authors

Galina A. Teterina – investigation, writing – original draft, visualization.
Valentina P. Salovarova – project administration, supervision, editing.
Yuri P. Dzhioev – conceptualization, supervision, resources, data curation, formal analysis.
Nadezhda A. Arefieva – software, validation.
Andrey Yu. Borisenko – methodology, investigation.
Yuri S. Bukin – resources, supervision, software, validation, editing.
Sergey V. Erdyneev – investigation, visualization.
Liliya A. Stepanenko – investigation, resources, data curation, formal analysis.
Dmitry A. Antipin – investigation.
Kristina B. Kakhiani – investigation.
Angelina E. Makarova – investigation.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Информация о статье

Поступила в редакцию 17.09.2024.
Одобрена после рецензирования 08.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

*The article was submitted 17.09.2024.
Approved after reviewing 08.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.*