

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-168-175

УДК 631.467.2:579.25(571.52)

Е.Г. Токмакова¹, Н.Ф. Галацевич², Л.П. Базанова¹, О.Л. Балган², А.С. Пономарёва¹, А.С. Остяк¹,
И.С. Акимова², С.В. Балахонов¹

О микрофлоре энтомопаразитических нематод из блох длиннохвостого суслика в Тувинском природном очаге чумы

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Тувинская противочумная станция», Кызыл, Российская Федерация

Энтомопаразитическим нематодам блох отводится определенная роль в персистенции *Yersinia pestis* в природных очагах, однако их естественное микробное окружение не изучено. **Цель** исследования – поиск бактерий – ассоциантов нематод, паразитирующих в блохах – переносчиках чумы в Тувинском природном очаге. **Материалы и методы.** Блох собирали в процессе плановых эпизоотологических обследований в мае 2017 и 2018 гг. При проведении таксономической идентификации насекомых регистрировали наличие паразитических нематод. В 2017 г. бактериологическое исследование блох, пораженных нематодами и свободных от них, проводили отдельно, без вскрытия. Учитывали присутствие и количество бактериальных колоний на агаровых пластинках. Результаты оценили общепринятыми методами с применением программы Excel. Использовали t-критерий, однофакторный дисперсионный анализ. В 2018 г. вскрыты 84 инвазированные блохи. Извлеченных нематод посеяли в бульон Хоттингера с последующим культивированием выросших бактерий на агаре Хоттингера. Систематическую принадлежность выделенных культур определили методами масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF) и частичного секвенирования 16S РНК. **Результаты и обсуждение.** В 2017 г. бактериологически исследовано 30 проб блох с гельминтами и 276 без них, в том числе 23 пробы инвазированных и 145 неинвазированных особей основного переносчика *Citellophilus tesquorum*. Статистические различия в доле образцов, обсемененных неприхотливыми бактериями, и влияние количества блох в пробе на число выросших колоний не выявлены. В 2018 г. из 23 образцов энтомопаразитических нематод выделены 26 культур бактерий родов *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Macroccoccus*, *Bacillus*. Обсуждаются возможные пути их проникновения в имаго блох.

Ключевые слова: бактерии, энтомопаразитические нематоды, блохи, Тувинский природный очаг чумы.

Корреспондирующий автор: Токмакова Елена Геннадьевна, e-mail: flea98@mail.ru.

Для цитирования: Токмакова Е.Г., Галацевич Н.Ф., Базанова Л.П., Балган О.Л., Пономарёва А.С., Остяк А.С., Акимова И.С., Балахонов С.В. О микрофлоре энтомопаразитических нематод из блох длиннохвостого суслика в Тувинском природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1:168–175. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-168-175

Поступила 25.09.2023. Отправлена на доработку 17.10.2023. Принята к публ. 13.11.2023.

E.G. Tokmakova¹, N.F. Galatsevich², L.P. Bazanova¹, O.L. Balgan², A.S. Ponomareva¹, A.S. Ostyak¹,
I.S. Akimova², S.V. Balakhonov¹

On Microflora of Entomoparasitic Nematodes from Long-Tailed Souslik Fleas in Tuva Mountain Natural Plague Focus

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation;

²Tuva Plague Control Station, Kyzyl, Russian Federation

Abstract. Entomoparasitic nematodes have a specific role to play in the persistence of *Yersinia pestis* in natural foci, however their natural microbial environment has not been studied. **The aim** of the study was to search for bacteria associated with nematodes parasitizing fleas-vectors of plague in the Tuva natural focus. **Materials and methods.** Fleas were collected during the planned epizootiological surveillance in May, 2017 and 2018. During the taxonomic identification of insects, the presence of parasitic nematodes was recorded. In 2017, bacteriological examination of fleas affected by nematodes and those free from them was carried out separately without dissection. The presence and number of bacteria colonies on the agar plates were taken into account. The results were evaluated by conventional methods using the Excel program. The t-criterion, one-factor analysis of variance were employed. In 2018, 84 invaded fleas were dissected. Extracted nematodes were suspended in Hottinger's broth, followed by cultivation of grown bacteria on Hottinger's agar. Systematic position of isolated cultures was determined through mass spectrometric analysis (MALDI-TOF) and partial sequencing of 16S rRNA. **Results and discussion.** In 2017, 30 samples of fleas with helminthes and 276 without helminthes were bacteriologically examined, including 23 samples infested and 145 non-infested specimens of the main vector, *Citellophilus tesquorum*. Statistical differences in the proportion of samples contaminated by unpretentious bacteria and effect of flea abundance in the sample on the number of colonies grown have not been revealed. In 2018, 26 cultures of bacteria of the genera *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Macroccoccus*, and *Bacillus* were isolated from 23 samples of entomoparasitic nematodes. Possible ways of their penetration into flea imagoes are discussed.

Key words: bacteria, entomoparasitic nematodes, fleas, Tuva natural plague focus.

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

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

Corresponding author: Elena G. Tokmakova, e-mail: flea98@mail.ru.

Citation: Tokmakova E.G., Galatsevich N.F., Bazanova L.P., Balgan O.L., Ponomareva A.S., Ostyak A.S., Akimova I.S., Balakhonov S.V. On Microflora of Entomoparasitic Nematodes from Long-Tailed Souslik Fleas in Tuva Mountain Natural Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 1:168–175. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-168-175

Received 25.09.2023. Revised 17.10.2023. Accepted 13.11.2023.

Tokmakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3416-6602>
 Bazanova L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8086-9886>
 Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>

Ostyak A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9391-6779>
 Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Представления о том, как могут развиваться отношения между нематодами – паразитами блох и возбудителем чумы, основываются на экспериментах с модельным видом *Caenorhabditis elegans* [1, 2] и лишь частично отражают происходящее в естественных условиях. Новыми исследованиями показана возможность распространения *Yersinia pestis* филогенетической линии 4.ANT во внешней среде почвенными нематодами рода *Panagrolaimus* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы [3]. Нематоды – паразиты блох из этого очага отнесены к роду *Rubzovinema* [4]. Гельминты той же систематической принадлежности выделены из блох *Citellophilus tesquorum* с энзоотичной по чуме территории Республики Тыва [5]. До 2014 г. род включал только один монохозяинный вид *Rubzovinema ceratophylla*, однако обнаруженные в Волго-Уральском степном очаге чумы изоляты охарактеризованы как принадлежащие к новому виду – *Rubzovinema polyxenica* [6, 7].

Факты симбиоза с бактериями, известные для энтомопатогенных нематод (Steinernematidae – *Xenorhabdus*) и (Heterorhabditidae – *Photorhabdus*) [8–11], дополняются сведениями о бактериях другой систематической принадлежности: *Providencia vermicola* и *Flavobacterium* sp. [12], *Serratia nema-*

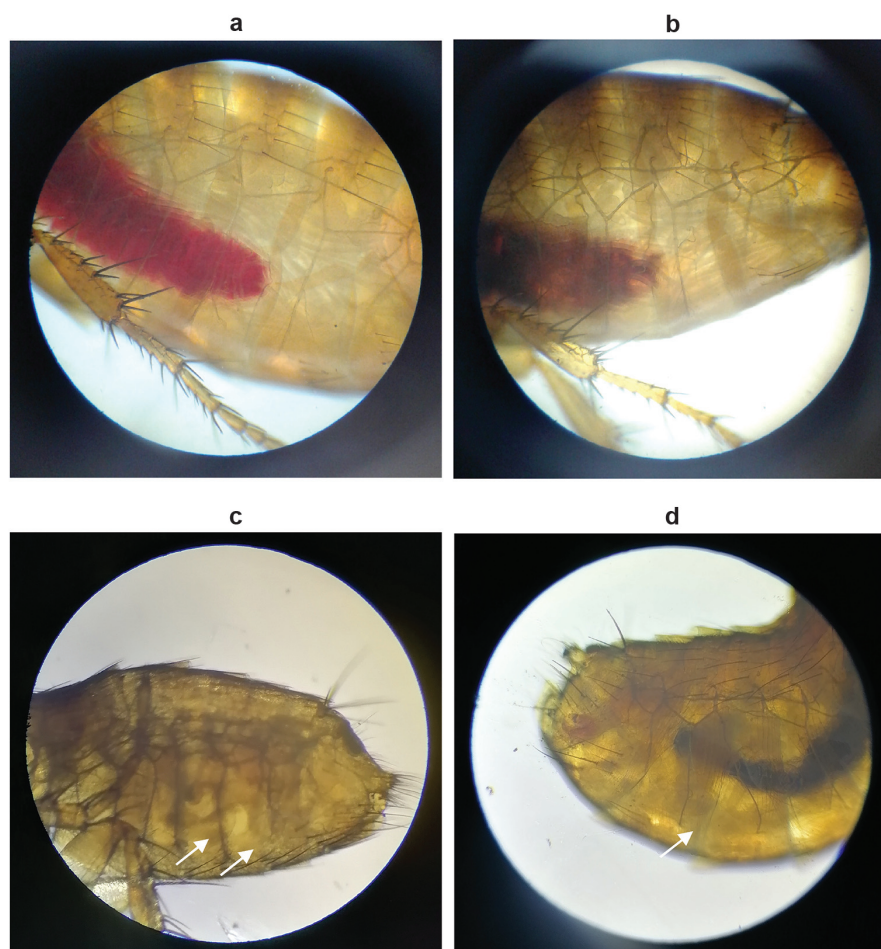
todiphila [13], *Serratia marcescens* и *Providencia rettgeri* [14], *P. vermicola*, *Pseudomonas entomophila*, *Alcaligenes aquatilis*, *Alcaligenes faecalis* [15]. У этих бактерий есть два интересных в практическом отношении свойства: первое – способность к росту на простых питательных средах, второе – антибактериальная и фунгицидная активность, реализуемая через комплекс биологически активных веществ. У нематод рода *Rubzovinema* к настоящему времени обнаружены бактерии рода *Wolbachia* [5], не способные к автономному существованию.

Цель работы – поиск бактерий – ассоциантов энтомопаразитических нематод из блох в Тувинском природном очаге чумы.

Материалы и методы

Блох собирали в мае 2017 и 2018 гг. во время планового обследования Тувинского природного очага чумы в соответствии с МУ 3.1.3012-12. При таксономической идентификации отделяли особей, зараженных или подозрительных на зараженность гельминтами (рисунок).

В 2017 г. бактериологические исследования блох, пораженных нематодами, и блох без нематод проведены отдельно. Количество блох в одной пробе



Вид блох, пораженных энтомопаразитическими нематодами, в световом микроскопе:

a, b – многочисленные личинки заполняют брюшную полость блохи; *c* – две взрослые самки нематод (показаны стрелками); *d* – одна взрослая самка нематоды, обвившаяся вокруг желудка блохи.

Примечание: снимки сделаны камерой мобильного телефона через окуляр микроскопа с увеличением 7×, увеличение объектива – 8×, увеличение бинокулярной насадки – 1,5×

Appearance of fleas affected by entomoparasitic nematodes displayed in light microscope:

a, b – numerous larvae fill the abdominal cavity of the flea; *c* – two adult female nematodes (shown by arrows); *d* – one adult female nematode wrapped around the stomach of the flea.

Note: photos were taken with a mobile phone camera through a microscope eyepiece with 7× magnification, objective magnification is 8×, binocular attachment magnification is 1.5×

колебалось от 1 до 10 (без гельминтов) или от 1 до 13 (с гельминтами). Блох, обездвиженных парами эфира, растирали в стерильной фарфоровой ступке стерильным фарфоровым пестиком с несколькими каплями 0,9 % стерильного изотонического раствора хлорида натрия. Этим же пестиком наносили полученную суспензию на сектор агаровой пластинки. При ежедневном просмотре посевов в течение 5 суток, как это предписывает МУК 4.2.2940-11, учитывали количество и однородность всех колоний микроорганизмов, кроме плесневых грибов, не идентифицируя их. Посевы мертвых блох в анализ не включали. Статистическую обработку провели общепринятыми методами [16] с применением программы Excel. Использовали t-критерий, однофакторный дисперсионный анализ.

В 2018 г. сеяли непосредственно паразитических нематод. Блох с гельминтами предварительно промывали в 96 % спирте и далее в дистиллированной воде, чтобы избавиться от микроорганизмов с наружных покровов насекомых. Блоху вскрывали при помощи двух препаровальных игл в капле 0,9 % стерильного изотонического раствора хлорида натрия на предметном стекле с лункой, которое укладывали в крышку от чашки Петри. Пищеварительный тракт переносили в микропробирку, заполненную стерильным бульоном Хоттингера (1 мл), и растирали препаровальной иглой для дальнейшего исследования на наличие возбудителя чумы. Затем чашку Петри ставили на темный фон. Зрелые паразитические самки различимы невооруженным глазом. Личинки без микроскопирования видны только при их обилии – как скопление искр в падающем свете. Нематод собирали вместе с 0,9 % раствора хлорида натрия пипеткой-дозатором и переносили в микропробирки, содержащие 1000 мкл асептически разлитого бульона Хоттингера, для сохранения и накопления имеющихся бактерий. После каждой блохи предметное стекло и препаровальные иглы обжигали в пламени 95 % спирта. Бульон Хоттингера инкубировали в течение двух недель при температуре окружающего воздуха 5–12 °С, после чего делали высев петлей на чашки агара Хоттингера с последующим культивированием при 28 °С. Температуру, предпочтительную для изолированных микроорганизмов, определяли параллельной инкубацией на той же среде при 28 и 37 °С в течение 24 ч. Культуры идентифицировали масс-спектрометрическим методом (MALDI-TOF) на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) в соответствии с МУ 4.2.0089-14. Часть культур с ненадежными результатами масс-спектрометрической идентификации тестировали молекулярно-генетическим методом (секвенирование участка гена *16S* РНК по методу Сэнгера) [17]. Выделенную ДНК амплифицировали с универсальными праймерами к участку гена *16S* РНК 5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3' (P16S-F) и 5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3' (P16S-R) [18]. Далее проводили ферментативную очистку ПЦР-продукта, сиквенсную реакцию и очистку ее продукта.

Продукты сиквенсной реакции разделяли электрофоретически на автоматическом ДНК-анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Поиск последовательностей, гомологичных секвенированным, осуществлялся по базе данных *16S* rRNA seq с помощью программы Blastn версии 2.13.0.

Результаты и обсуждение

В 2017 г. возбудителя чумы не обнаружили. При выявлении микрофлоры, традиционно обозначаемой как «посторонняя», исходили из двух предположений: 1) наличие симбиотических бактерий, растущих на простых питательных средах, – по обнаружению в посевах инвазированных блох колоний, морфологически схожих, при отсутствии подобных в остальных посевах; 2) наличие симбиотических бактерий, не способных к росту на простых питательных средах, – по подавлению роста других микроорганизмов в посевах блох, пораженных нематодами, в результате взаимодействия в организме блохи и (или) пролонгированной ингибиции метаболитами предполагаемых симбионтов. Всего просмотрено 30 посевов блох с гельминтами и 276 – без гельминтов. Большую их часть составляли *C. tesquorum*: 23 и 145 проб соответственно. Из инвазированных блох рост разнообразных микроорганизмов наблюдали у 5 проб, все они принадлежали *C. tesquorum* (16,7 % от общего количества проб; 21,7 % от количества проб *C. tesquorum*). В посевах неинвазированных блох проросли 70 проб без учета их видовой принадлежности (25,4 %; $t=1,19$; $P>0,05$) и 48 проб основного переносчика (33,1 %; $t=1,20$; $P>0,05$). Хотя доля случаев с «посторонней» микрофлорой среди посевов инвазированных особей была несколько ниже, различия статистически не значимы ни для всех блох, ни при исследовании *C. tesquorum*. Кроме того, подсчитывали количество выросших колоний. Наибольшее их количество – 40 – учтено в групповом посеве блох (10 экземпляров) без гельминтов. В то же время в половине посевов таких же проб рост бактерий отсутствовал. Из 5 проб инвазированных *C. tesquorum* с ростом бактерий на четырех чашках выросло по одной колонии (из 1, 2, 2 и 10 блох) и на одной – три (из 8 блох). Влияния количества блох в пробе на количество выросших колоний не доказано ни в присутствии гельминтов (однофакторный дисперсионный анализ, $F=1,22$), ни без них ($F=1,77$). Таким образом, блохи вне зависимости от инвазии не обладают общим для всех комплексом неприхотливых бактерий, который бы проявлялся через «кумулятивный эффект» в объединенном посеве. Наши результаты согласуются с данными Н. Li *et al.* о том, что бактериальное сообщество блох формируется случайным образом [19].

В 2018 г. исследование блох на наличие возбудителя чумы также завершилось с отрицательным результатом, в том числе 84 вскрытых инвазирован-

Таблица 1 / Table 1

Результаты идентификации культур, выделенных из препаратов энтомопаразитических нематод
Results of identification of cultures isolated from preparations of entomoparasitic nematodes

№ п/п No.	№ культуры Culture No.	MALDI-TOF		Секвенирование 16S РНК Sequencing of 16S rRNA	
		Вид микроорганизма Species of microorganism	Максимальный числовой показатель (Score value)* Maximum numeric value (Score value)*	Вид микроорганизма Species of microorganism	Идентичность, % / покрытие последовательности, % Identity, % / sequence coverage, %
1	2	3	4	5	6
1	83	<i>Staphylococcus equorum</i>	1,823	<i>Staphylococcus equorum</i>	100 / 100
2	84	<i>Serratia proteamaculans</i>	2,342	Не исследовали Not studied	
		<i>Serratia liquefaciens</i>	2,102		
3	85-1	<i>Staphylococcus equorum</i>	1,789	Не исследовали Not studied	
4	85-2	<i>Serratia proteamaculans</i>	2,315		
		<i>Serratia liquefaciens</i>	2,11	<i>Serratia</i> sp.	99,87 / 100
		<i>Serratia grimesii</i>	1,937		
5	87	<i>Staphylococcus succinus</i>	1,841	<i>Staphylococcus xylosum</i>	100 / 100
				<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	
6	95-1	Нет идентификации No identification		<i>Staphylococcus sp.</i>	100 / 100
				<i>Staphylococcus equorum</i>	100 / 99
7	95-2	Нет идентификации No identification		<i>Kocuria rosea</i>	99,88 / 100
				Некультивируемый бактериальный клон pcd1270b08c Uncultured bacterium clone pcd1270b08c	
				<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99,75 / 100
				<i>Acinetobacter</i> sp.	
8	96	<i>Staphylococcus succinus</i>	1,772	<i>Staphylococcus succinus</i>	100 / 100
				<i>Staphylococcus xylosum</i>	
9	111	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,145	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	
				Не исследовали Not studied	
10	138	<i>Staphylococcus equorum</i>	2,05	Не исследовали Not studied	
11	139	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,176	Не исследовали Not studied	
12	250	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,069	Не исследовали Not studied	
		<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1,893	Не исследовали Not studied	
13	251	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,147	Не исследовали Not studied	

Окончание таблицы / Ending of the table

1	2	3	4	5	6
14	257	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1,973	Некультивируемый бактериальный клон G250WV301A9957 Uncultured bacterium clone G250WV301A9957	98,15 / 99
		<i>Pseudomonas mucidolens</i>	1,967	Некультивируемый бактериальный клон 4811 и ряд других Uncultured bacterial clone 4811 and others	97,53 / 99
		<i>Pseudomonas libanensis</i>	1,932		
		<i>Pseudomonas synxantha</i>	1,93		
		<i>Pseudomonas trivialis</i>	1,926		
15	270	<i>Pseudomonas synxantha</i>	2,381	Не исследовали Not studied	96,91 / 99
		<i>Pseudomonas libanensis</i>	2,239		
		<i>Staphylococcus equorum</i>	1,729		
16	283	<i>Staphylococcus equorum</i>	1,729	<i>Staphylococcus equorum</i>	100 / 100
		<i>Kocuria rosea</i>		<i>Kocuria rosea</i>	100 / 99
17	286	<i>Staphylococcus succinus</i>	1,9	<i>Staphylococcus xylosus</i>	100 / 100
				<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	
				<i>Staphylococcus</i> sp.	
18	291	<i>Staphylococcus equorum</i>	1,753	Не исследовали Not studied	
		<i>Staphylococcus succinus</i>	1,742		
19	293	<i>Bacillus indicus</i>	1,816	Не исследовали Not studied	
20	294-1	<i>Macrocoscus caseolyticus</i>	1,998	<i>Macrocoscus caseolyticus</i>	99,75 / 100
				<i>Macrocoscus</i> sp.	99,62 / 100
21	294-2	Нет идентификации No identification		<i>Macrocoscus goetzii</i>	99,75 / 100
				<i>Macrocoscus</i> sp.	
				<i>Macrocoscus epidermidis</i>	
22	295	<i>Staphylococcus succinus</i>	1,894	Некультивируемый бактериальный клон nbw1185d05c1 и ряд других Uncultured bacterial clone nbw1185d05c1 and others	99,88 / 100
				<i>Staphylococcus xylosus</i>	
				<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	
23	296	<i>Pseudomonas fragi</i>	1,895	Не исследовали Not studied	
		<i>Pseudomonas lundensis</i>	1,835		
24	319	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,114	Не исследовали Not studied	
25	321	<i>Staphylococcus succinus</i>	2,048	Не исследовали Not studied	
26	325	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1,78	Некультивируемый бактериальный клон Illumina 2542 и ряд других Uncultured bacterial clone Illumina 2542 and others	96,91 / 98
		<i>Pseudomonas fragi</i>	1,77	<i>Pseudomonas fragi</i>	96,30 / 98
		<i>Pseudomonas</i> sp.			
		<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>			
		<i>Pseudomonas psychrophila</i>			

Примечание: * достоверность полученных результатов характеризуется значением Score (Score value): значение 2,300–3,000 соответствует высокому уровню (достоверности) видовой идентификации; 2,000–2,299 – надежной родовой идентификации, возможной видовой; 1,700–1,999 – возможной родовой идентификации; 0,000–1,699 – невозможной родовой идентификации.

Note: * the reliability of the results obtained is characterized by the value of "Score" (Score value): the value of 2.300–3.000 corresponds to a high level (reliability) of species identification; 2.000–2.299 – reliable generic identification, possible species; 1.700–1.999 – possible generic identification; 0.000–1.699 – unreliable identification.

Таблица 2 / Table 2

Рост культур, выделенных из нематод, через 24 ч
Growth of cultures, isolated from nematodes, 24 h on

№ культуры Culture No.	Результат идентификации Result of identification	Рост при температуре / Growth at	
		28 °C	37 °C
83	<i>S. equorum</i>	умеренный / moderate	умеренный / moderate
95-1	<i>S. equorum</i>	умеренный / moderate	умеренный / moderate
250	<i>S. warneri</i>	умеренный / moderate	слабый / weak
257	<i>Pseudomonas</i> sp.	умеренный / moderate	нет роста / no growth
270	<i>P. synxantha</i>	умеренный / moderate	слабый / weak
283	<i>S. equorum</i>	умеренный / moderate	слабый / weak
294-1	<i>M. caseolyticus</i>	умеренный / moderate	пышный / lush
295	<i>Staphylococcus</i> sp.	умеренный / moderate	пышный / lush
296	<i>Pseudomonas</i> sp.	пышный / lush	очень слабый / very weak
325	<i>P. fragi</i>	умеренный / moderate	умеренный / moderate

ных блох. В 23 образцах (27,7 %) полученных из них нематод наблюдали рост бактерий других видов по штриху. В трех случаях выделено по две культуры, в остальных посевах культура была однородной. Две культуры отнесены к роду *Acinetobacter*, одна – *Bacillus*, две – *Macroccoccus*, три – *Pseudomonas*, две – *Serratia proteamaculans*, но больше всего – 16 – было стафилококков (табл. 1).

Очевидно, что выделенные культуры не обязательно принадлежали собственно нематодам, а могли попасть в посев с остатками гемолимфы или фрагментами тела насекомого. Бактериальные семейства *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Staphylococcaceae* входят в состав общего «ядра» эктосимбионтов кровососущих насекомых и клещей, населяющих кишечник, слюнные железы, мальпигиевы сосуды и репродуктивные органы, причем у насекомых с полным превращением у кишечной микрофлоры личинок мало шансов сохраниться до фазы имаго [20]. На примере божьей коровки *Harmonia axiridis* показано, что ацинетобактер и стафилококки, в частности *S. succinus*, входят в состав обычной микробиоты насекомых независимо от их заражения нематодами. В то же время серрации (*Serratia marcescens*) выделяли только от инвазированных жуков, в эксперименте при отсутствии нематод они были убийственны, приводя к гибели 80–100 % насекомых (в зависимости от дозы). Предполагается, что энтомопаразитические нематоды подавляют рост и вирулентность бактериальных патогенов, а бактерии супрессируют защитные механизмы насекомых против нематод, облегчая инвазию [14]. Божьи коровки – хищники, но при отсутствии животной пищи способны питаться фруктами и ягодами. Их рацион разнообразен и нестерилизован, в отличие от пищи взрослых блох – облигатных гематофагов. При этом четверть имаго блох содержала микроорганизмы, которые не могли попасть к ним из крови теплокровных хозяев хотя бы потому, что температура последних не является оптимальной для них (табл. 2).

Изолированные бактерии могут быть остатком личиночной микрофлоры блох. В литературе описаны два возможных пути трансфазовой передачи бактерий у блох. В окуклившейся блохе при линьке выстилки пищеварительного тракта происходит ее разрыв на границе между задней и средней кишкой, через который в некоторых случаях остатки личиночной пищи попадают в полость тела куколки и далее взрослого насекомого [21]. При скармливании личинкам блох живой сухой чумной вакцины бактерии способны проникать в эндоплазму паразитирующих в них гамонтов грегаринов и сохраняться там в течение двух суток (срок наблюдения), в то время как в кишечнике личинок они обнаруживаются только в первые часы после заражения, а потом исчезают [22]. Не исключено, что одни бактерии попадают в имаго первым способом, а другие – вторым.

Таким образом, наблюдения, проведенные в 2017 г., не выявили качественных и количественных особенностей в высеваемости непрехотливых бактерий из блох, инвазированных и не инвазированных энтомопаразитическими нематодами. Можно предположить, что эта часть бактериального сообщества у блох Тувинского природного очага чумы формируется случайно. В образцах нематод, собранных в 2018 г., обнаружены бактерии родов *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Macroccoccus*, *Bacillus*.

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

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

Список литературы

1. Zhou D., Yang R. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms. *Protein Cell*. 2011; 2(3):173–9. DOI: 10.1007/s13238-011-1024-3.
2. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С.,

- Бойко А.В., Кутырев В.В. Изучение образования биопленки у беспиgmentных и бесплазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 3:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
3. Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Шарапова Н.А., Самойлов А.Е., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Влияние *Yersinia pestis* на почвенных нематод *Panagrolaimus* sp. из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:127–33. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-127-133.
4. Оглодин Е.Г., Токмакова Е.Г., Никифоров К.А., Денисов А.В., Шарапова Н.А., Ерошенко Г.А. Систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод, выделенных от блох в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:79–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-79-83.
5. Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Токмакова Е.Г. Выявление симбионтов энтомопаразитических нематод *Rubzovinema* sp. из Тувинского горного очага чумы. В кн.: Попова А.Ю., Бакирова А.Б., редакторы. Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Уфа, 2–4 октября 2019 г.). Уфа; 2019. С. 255–9.
6. Koshel E.I., Aleshin V.V., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic analysis of entomoparasitic nematodes, potential control agents of flea populations in natural foci of plague. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:135218. DOI: 10.1155/2014/135218.
7. Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Поршаков А.М., Князева Т.В., Краснов Я.М., Мокроусова Т.В., Новичкова Л.А., Анисимова Л.В. Характеристика энтомопаразитических нематод блох мелких грызунов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:32–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-32-37.
8. Рысс А.Ю., Кулинич О.А., Турицин В.С., Мазурин Е.С. Мутуалистические комплексы нематод и бактерий, ассоциированные с насекомыми. *Энтомологическое обозрение*. 2011; 90(3):662–71.
9. Kuwata R., Qiu L.H., Wang W., Harada Y., Yoshida M., Kondo E., Yoshiga T. *Xenorhabdus ishishashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema acari*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt. 5):1690–5. DOI: 10.1099/ijss.0.041145-0.
10. Sajana E., Kazimierzczak W., Skowronek M., Lis M., Skrzypek T., Waśko A. *Steinernema poinari* (Nematoda: Steinernematidae): a new symbiotic host of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii*. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1307–16. DOI: 10.1007/s00203-018-1544-9.
11. Yooyangkiet T., Muangpat P., Polseela R., Tandhavanant S., Thanwisai A., Vitta A. Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLoS One*. 2018; 13(4):e0195681. DOI: 10.1371/journal.pone.0195681.
12. Yi Y.K., Park H.W., Shrestha S., Seo J., Kim Y.O., Shin C.S., Kim Y. Identification of two entomopathogenic bacteria from a nematode pathogenic to the Oriental beetle, *Blitopertha orientalis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 17(6):968–78.
13. Zhang C.X., Yang S.Y., Xu M.X., Sun J., Liu H., Liu J.R., Liu H., Kan F., Sun J., Lai R., Zhang K.Y. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009; 59(Pt. 7):1603–8. DOI: 10.1099/ijss.0.003871-0.
14. Gegner T., Carrau T., Vilcinskis A., Lee K.Z. The infection of *Harmonia axyridis* by a parasitic nematode is mediated by entomopathogenic bacteria and triggers sex-specific host immune responses. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):15938. DOI: 10.1038/s41598-018-34278-x.
15. Pervaz R., Lone Sh. A., Pattnaik S. Characterization of symbiotic and associated bacteria from entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. (nematode: Heterorhabditidae) isolated from India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2020; 30(1):144. DOI: 10.1186/s41938-020-00343-9.
16. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйш. школа; 1973. 320 с.
17. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; 94(32):444–8. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
18. Binsztien N., Costagliola M.C., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez F.C., Akselman R., Vaccino M., Huq A., Colwell R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(12):7481–6. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004.
19. Li H., Li T., Qu J. Stochastic processes govern bacterial communities from the blood of pikas and from their arthropod vectors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018; 94(6). DOI: 10.1093/femsec/fiy082.
20. Sonenshine D.E., Stewart P.E. Microbiomes of blood-feeding arthropods: genes coding for essential nutrients and relation to vector fitness and pathogenic infections. A review. *Microorganisms*. 2021; 9(12):2433. DOI: 10.3390/microorganisms9122433.
21. Прокопьев В.Н. Причины положительного реагирования на бензидиновую пробу у блох, не пивших крови. В кн.: Степанченко А.И., редактор. Доклады Иркутского противочумного института. Улан-Удэ; 1961. Вып. 1. С. 92–3.
22. Чумакова И.В., Тохов Ю.М. Роль эндопаразитов блох диких грызунов в энзоотии чумы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2013; 1:18–20.

References

- Zhou D., Yang R. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms. *Protein Cell*. 2011; 2(3):173–9. DOI: 10.1007/s13238-011-1024-3.
- Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odnokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Ya.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Eroshin P.S., Boiko A.V., Kutyrev V.V. [Studies of biofilm formation in non-pigmented and plasmid-deprived mutants of *Yersinia pestis* on biotic surfaces, *in vivo* and *in vitro* conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2012; (3):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
- Makashova M.A., Oglochin E.G., Sharapova N.A., Samoilov A.E., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Effect of *Yersinia pestis* on the soil nematodes *Panagrolaimus* sp. from the Gorno-Altai high-mountain focus of plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; (2):127–33. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-127-133.
- Oglochin E.G., Tokmakova E.G., Nikiforov K.A., Denisov A.V., Sharapova N.A., Eroshenko G.A. [Taxonomic position of entomoparasitic nematodes isolated from fleas in Gorno-Altai high-mountain natural plague focus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; (2):79–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-79-83.
- Makashova M.A., Oglochin E.G., Tokmakova E.G. [Identification of symbionts of *Rubzovinema* sp. entomoparasitic nematodes from Tuva mountain plague focus]. In: Popova A.Yu., Bakirova A.B., editors. Current Problems of Epidemiology, Microbiology and Hygiene. Proceedings of the XI All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of the Rospotrebnadzor (Ufa, October 2–4, 2019). Ufa; 2019. P. 255–9.
- Koshel E.I., Aleshin V.V., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic analysis of entomoparasitic nematodes, potential control agents of flea populations in natural foci of plague. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:135218. DOI: 10.1155/2014/135218.
- Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Porshakov A.M., Knyazeva T.V., Krasnov Ya.M., Mokrousova T.V., Novichkova L.A., Anisimova L.V. [Characteristics of entomoparasitic nematodes of small rodent fleas]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; (3):32–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-32-37.
- Ryss A.Yu., Kulich O.A., Turitsin V.S., Mazurin E.S. [Mutualistic nematode–bacteria associations co-inhabiting with insect vectors and hosts]. *Entomological Review*. 2011; 90(3):662–71.
- Kuwata R., Qiu L.H., Wang W., Harada Y., Yoshida M., Kondo E., Yoshiga T. *Xenorhabdus ishishashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema acari*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt. 5):1690–5. DOI: 10.1099/ijss.0.041145-0.
- Sajana E., Kazimierzczak W., Skowronek M., Lis M., Skrzypek T., Waśko A. *Steinernema poinari* (Nematoda: Steinernematidae): a new symbiotic host of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii*. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1307–16. DOI: 10.1007/s00203-018-1544-9.
- Yooyangkiet T., Muangpat P., Polseela R., Tandhavanant S., Thanwisai A., Vitta A. Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLoS One*. 2018; 13(4):e0195681. DOI: 10.1371/journal.pone.0195681.
- Yi Y.K., Park H.W., Shrestha S., Seo J., Kim Y.O., Shin C.S., Kim Y. Identification of two entomopathogenic bacteria from a nematode pathogenic to the Oriental beetle, *Blitopertha orientalis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 17(6):968–78.
- Zhang C.X., Yang S.Y., Xu M.X., Sun J., Liu H., Liu J.R., Liu H., Kan F., Sun J., Lai R., Zhang K.Y. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009; 59(Pt. 7):1603–8. DOI: 10.1099/ijss.0.003871-0.
- Gegner T., Carrau T., Vilcinskis A., Lee K.Z. The infection of *Harmonia axyridis* by a parasitic nematode is mediated by entomopathogenic bacteria and triggers sex-specific host immune responses. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):15938. DOI: 10.1038/s41598-018-34278-x.
- Pervaz R., Lone Sh. A., Pattnaik S. Characterization of symbiotic and associated bacteria from entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. (nematode: Heterorhabditidae) isolated from India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2020; 30(1):144. DOI: 10.1186/s41938-020-00343-9.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйш. школа; 1973. 320 с.
- Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; 94(32):444–8. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Binsztien N., Costagliola M.C., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez F.C., Akselman R., Vaccino M., Huq A., Colwell R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(12):7481–6. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004.
- Li H., Li T., Qu J. Stochastic processes govern bacterial communities from the blood of pikas and from their arthropod vectors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018; 94(6). DOI: 10.1093/femsec/fiy082.
- Sonenshine D.E., Stewart P.E. Microbiomes of blood-feeding arthropods: genes coding for essential nutrients and relation to

15. Pervez R., Lone Sh. A., Pattnaik S. Characterization of symbiotic and associated bacteria from entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. (nematode: Heterorhabditidae) isolated from India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2020; 30(1):144. DOI: 10.1186/s41938-020-00343-9.
16. Rokitsky P.F. [Biological Statistics]. Minsk: "Vysheyschaya Shkola"; 1973. 320 p.
17. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; 94(32):444–8. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
18. Binsztein N., Costagliola M.C., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez F.C., Akselman R., Vacchino M., Huq A., Colwell R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(12):7481–6. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004.
19. Li H., Li T., Qu J. Stochastic processes govern bacterial communities from the blood of pikas and from their arthropod vectors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018; 94(6). DOI: 10.1093/femsec/fiy082.
20. Sonenshine D.E., Stewart P.E. Microbiomes of blood-feeding arthropods: genes coding for essential nutrients and relation to vector fitness and pathogenic infections. A review. *Microorganisms*. 2021; 9(12):2433. DOI: 10.3390/microorganisms9122433.
21. Prokop'ev V.N. [The causes of positive reaction to benzidine test in fleas that did not drink blood]. In: Stepanchenko A.I., editor. [Proceedings of Irkutsk Anti-Plague Institute]. Ulan-Ude; 1961. Iss. 1. P. 92–3.
22. Chumakova I.V., Tokhov Yu.M. [Role of endoparasites of fleas of wild rodents in plague enzooty]. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2013; (1):18–20.

Authors:

Tokmakova E.G., Bazanova L.P., Ponomareva A.S., Ostyak A.S., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Galatsevich N.F., Balgan O.L., Akimova I.S. Tuva Plague Control Station. 13, Moskovskaya St., Kyzyl, 667010, Russian Federation. E-mail: pchs@tuva.ru.

Об авторах:

Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Пономарёва А.С., Остяк А.С., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Галацевич Н.Ф., Балган О.Л., Акимова И.С. Тувинская противочумная станция. Российская Федерация, 667010, Кызыл, ул. Московская, 13. E-mail: pchs@tuva.ru.