

Выявление генетических детерминант устойчивости к тяжелым металлам в геномах *Vibrio cholerae*

А.В.Евтеев, С.О.Водопьянов, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Актуальность работы обусловлена проблемой идентификации генетических факторов, обеспечивающих персистенцию холерных вибрионов с позиции их устойчивости к тяжелым металлам (ТМ). Целью работы было создание базы данных MetGenes и программной оболочки HeavyMetallsAnalyser, позволяющей проводить поиск генов, обеспечивающих устойчивость к ТМ, осуществленной с использованием ресурсов BacMet, UniProt, NCBI и открытых публикаций. База MetGenes объемом 6,58 Мб содержит информацию о 5125 генах устойчивости и предназначена для анализа данных секвенирования и поиска детерминант устойчивости к ТМ без необходимости подключения к сети Интернет. Разработанный программный продукт апробирован при анализе полных нуклеотидных последовательностей 38 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 (НАГ-вибрионов) различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации из объектов окружающей среды и клинического материала в рамках ежегодного мониторинга холеры. В изученной выборке геномов идентифицировано 44 гена устойчивости к ТМ, которые разделили на 2 группы. К 1-й группе относились гены, которые присутствуют во всех штаммах, например *Zinc ribbon-containing protein*, *Zinc ABC transporter periplasmic zinc-binding protein*, ко 2-й – гены, которые присутствуют в единичных штаммах, например *acr3 family arsenite efflux transporter*. Данный ген был обнаружен в 12 штаммах НАГ-вибрионов, выделенных в 2024 г., из них 1 штамм клинический, а остальные 11 изолятов были выделены из объектов окружающей среды. При этом среди изученных культур, выделенных в 2023 г., данный ген нами обнаружен не был. *CzcC* был обнаружен нами в 4 штаммах НАГ-вибрионов (1 клинический, 3 из объектов окружающей среды), выделенных в 2023 г., в то время как среди штаммов 2024 г. данный ген обнаружен не был. Созданная база данных MetGenes и программная оболочка HeavyMetallsAnalyser представляют собой эффективный инструмент для изучения генетических механизмов устойчивости микроорганизмов к широкому спектру ТМ.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, тяжелые металлы, база данных, гены резистентности, анализ полногеномных сиквенсов

Для цитирования: Евтеев А.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. Выявление генетических детерминант устойчивости к тяжелым металлам в геномах *Vibrio cholerae*. Бактериология. 2026; 11(1): 19–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-19-25

Identification of genetic determinants of heavy metal resistance in *Vibrio cholerae* genomes

A.V.Evteev, S.O.Vodopyanov, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

The relevance of this study stems from the challenge of identifying genetic factors that ensure the persistence of cholera vibrio in terms of their resistance to heavy metals (HM). The aim of the work was to create the “MetGenes” database and the “HeavyMetallsAnalyser” software package, which enable the search for genes responsible for HM resistance, using data from the BacMet, UniProt, NCBI databases and open scientific publications.

The “MetGenes” database (6.58 MB) contains information on 5,125 resistance genes and is designed for sequencing data analysis and identification of heavy metal resistance determinants without requiring an Internet connection. The developed software product was tested on the analysis of complete nucleotide sequences of 38 *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains of various serogroups, isolated within the Russian Federation from environmental sources and clinical material as part of the annual cholera monitoring program.

In the studied genome set, 44 heavy metal resistance genes were identified and divided into two groups. The first group included genes found in all strains, such as *Zinc ribbon-containing protein* and *Zinc ABC transporter periplasmic zinc-binding protein*. The second group included genes present only in individual strains, such as the *acr3 family arsenite efflux transporter*. This gene was found in twelve non-agglutinating *Vibrio* (NAG) strains isolated in 2024, including one clinical strain and eleven environmental isolates. Among the strains isolated in 2023, this gene was not detected. The *CzcC* gene was identified in four NAG strains (one clinical, three environmental) isolated in 2023, while it was absent among the 2024 isolates.

Для корреспонденции:

Евтеев Артём Владимирович, научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-9133

E-mail: evteev_av@antiplague.ru

ORCID: 0000-0002-0087-9153

Статья поступила 15.10.2025, принята к печати 30.03.2026

For correspondence:

Artem V. Evteev, Junior Researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-9133

E-mail: evteev_av@antiplague.ru

ORCID: 0000-0002-0087-9153

The article was received 15.10.2025, accepted for publication 30.03.2026

The developed “MetGenes” database and “HeavyMetalsAnalyser” software represent effective tools for studying the genetic mechanisms of microbial resistance to a wide range of HM.

Key words: *Vibrio cholerae*, heavy metals, database, resistance genes, whole-genome sequencing analysis

For citation: Evteev A.V., Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V. Identification of genetic determinants of heavy metal resistance in *Vibrio cholerae* genomes. Bacteriology. 2026; 11(1): 19–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-19-25

Антропогенное загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) – мышьяком, ртутью, кадмием и др. – является одной из наиболее актуальных экологических проблем, оказывая негативное воздействие на биосферу и создавая селективное давление на микроорганизмы [1, 2]. Одним из ключевых факторов выживаемости бактерий в таких условиях выступает устойчивость к ТМ, определяемая детерминантами резистентности [3]. Однако системный анализ таких генов осложняется разрозненностью информации, дублированием данных в различных базах (BacMet, NCBI, UniProt, AMRFinder), а также ограничениями их использования, включая необходимость постоянного интернет-подключения [4, 5]. В связи с этим актуальной задачей является создание автономных отечественных программных инструментов, обеспечивающих идентификацию генов металлорезистентности по данным полногеномного секвенирования [6, 7].

Особое внимание заслуживает возбудитель холеры *Vibrio cholerae*, который обладает высоким персистентным потенциалом, позволяющим выживать в загрязненных водоемах [8]. Данные молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что отдельные клоны *V. cholerae* O1, принадлежащие к некоторым кластерам, способны сохраняться длительное время [9]. Ранее выявлены потенциальные детерминанты, связанные с персистенцией нетоксигенных изолятов серогруппы O1: ген холодового шока (*csH1*) и ген *arsB*, кодирующий белок семейства ACR3 – эффлюкс-транспортер мышьяка, обеспечивающий устойчивость к его токсическому действию [10].

Система CzcCBA, относящаяся к семейству RND-транспортеров, обеспечивает устойчивость к кадмию, цинку и кобальту за счет активного выведения катионов из клетки [11–14]. Белок CzcC формирует канал наружной мембраны, взаимодействуя с белками CzcA и CzcB, и, хотя его утрата оказывает менее выраженный эффект, чем отсутствие CzcA или CzcB, данный белок играет вспомогательную роль в поддержании клеточного гомеостаза и повышении адаптивного потенциала бактерий в условиях повышенной концентрации ТМ. CzcC, CzcB и CzcA кодируют мембранный белковый комплекс, который обеспечивает устойчивость к ТМ за счет активного оттока катионов, управляемого катион-протонным антипортером. CzcC – белок наружной мембраны, участвующий в формировании канала для выведения ионов металлов из клетки. CzcB – периплазматический белок, выполняющий роль соединителя между CzcC и CzcA. CzcA – аналог RND, внутримембранный белок с несколькими трансмембранными α -спиралями, обеспечивающий основной транспортный поток ионов металлов. Утрата белков CzcA или CzcB приводит к значительному увеличению чувствительности клеток к кадмию, цинку и кобальту. Утрата CzcC оказывает менее выраженное влияние, что указывает на вспомогательную роль данного белка в системе. Белок CzcC также участвует в соз-

дании пути для выведения ионов металлов за пределы клетки; формирует трехкомпонентный комплекс с белками CzcB и CzcA; обеспечивает защиту клетки от токсичных концентраций кадмия, цинка и кобальта; участвует в регуляции внутриклеточного гомеостаза ионов металлов, необходимого для поддержания жизнеспособности клетки. Система CzcCBA представляет собой важный механизм адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды, связанным с воздействием ТМ [13–16].

V. cholerae nonO1/nonO139 (НАГ-вибрионы) широко распространены в природных экосистемах и представляют потенциальную угрозу здоровью населения. Эти штаммы отличаются высокой генетической изменчивостью и значительной адаптивной способностью. В отличие от клинических изолятов, штаммы, выделенные из объектов окружающей среды (ООС), демонстрируют более выраженную генетическую гетерогенность. Несмотря на ограниченный набор факторов патогенности, они сохраняют ключевые детерминанты персистенции, включая *hapA* (гемагглютинин-протеазу) и *cef* (колониционный фактор), которые обеспечивают сохранение жизнеспособности в неблагоприятных условиях [10]. НАГ-вибрионы рассматриваются как важный естественный резервуар генов, включая детерминанты устойчивости к антимикробным агентам и неблагоприятным факторам среды, что повышает их эпидемиологическое значение. Известно, что в геномах этих микроорганизмов широко распространены интегративные конъюгативные элементы (ICEs), ассоциированные с устойчивостью как к антибиотикам, так и к ТМ [17].

Следует подчеркнуть, что сведения о генах металлорезистентности у НАГ-вибрионов крайне ограничены. Большинство исследований сосредоточено на антибиотикорезистентности и факторах патогенности, тогда как данные о генетических детерминантах устойчивости к ТМ практически отсутствуют [18]. Между тем именно штаммы, циркулирующие в природных водоемах и контактирующие с техногенными источниками загрязнения (промышленные стоки, сельскохозяйственные сбросы, ТМ) могут играть ключевую роль в формировании и передаче генов устойчивости, способствуя долговременной персистенции *V. cholerae* в окружающей среде [19].

Целью настоящего исследования являлось выявление генетических детерминант устойчивости к тяжелым металлам у штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 с использованием созданных программных инструментов и сравнение полученных результатов с существующими базами данных.

Материалы и методы

Для анализа в работе использовали нуклеотидные последовательности 38 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных на территории Российской Федерации из ООС,

клинического материала в 2023–2024 гг. в рамках ежегодного мониторинга холеры. Секвенирование проведено в ходе выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». Полногеномное секвенирование проводилось с использованием платформы MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit. Библиотеку фрагментов ДНК получали с помощью набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Для индексирования библиотек использовали набор Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Сборка геномов выполнялась программой SPAdes v. 3.15.4 [20].

База данных MetGenes (6,58 Мб) создана на основе ресурсов VacMet, UniProt, NCBI и опубликованных данных. В нее включено 5125 генов, сгруппированных по типу металла и функциональной роли. База экспортируется в форматы CSV/TSV для интеграции с другими инструментами. Серотипы штаммов определяли с помощью SeqAnalyzer версии 2.4.0 [21].

Программа HeavyMetalsAnalyser разработана на Java и предназначена для анализа FASTA-файлов объемом до 10 Мб. Поиск выполняется с использованием алгоритмов BLASTX v.2.12.0+, с пороговыми значениями идентичности $\geq 90\%$, длиной совпадения ≥ 30 аминокислот и $e\text{-value} \leq 1e^{-5}$. Итоговый отчет содержит список генов с указанием функции и уровня сходства. Сравнение работы HeavyMetalsAnalyser проводили с использованием баз VacMet и AMRFinder для оценки точности и чувствительности поиска генов, связанных с устойчивостью к ТМ. Анализ проводился путем выполнения последовательного поиска гомологичных белковых последовательностей на основе нуклеотидных данных.

Результаты исследования и их обсуждение

База данных MetGenes включает данные о генах резистентности к мышьяку, цинку, никелю, теллуру, кобальту, ртути и кадмию. Распределение по металлам представлено в табл. 1.

База данных MetGenes объемом 6,58 Мб включает информацию о 5125 генах, обеспечивающих устойчивость к ТМ, включая такие значимые загрязнители, как мышьяк, цинк, кадмий, никель и теллур. База данных совместима с различными операционными системами и поддерживает экспорт данных для интеграции с другими программными системами. Гены в составе базы структурированы по типу металлов, к которым они обеспечивают устойчивость, а также по предполагаемым функциям и фенотипам индуцированной устойчивости. Важной особенностью базы данных является возможность фильтрации генов по заданным параметрам, что упрощает анализ и позволяет исследователям сосредоточиться на конкретных металлах или фенотипах. Данные о металлах и количестве генов в базе данных MetGenes представлены в табл. 1.

Программа для ЭВМ HeavyMetalsAnalyser представляет собой кроссплатформенную Java-программу, предназначенную для анализа полногеномных сиквенсов (FASTA-файлы до 10 Мб). Анализ включает:

Таблица 1. Число генов резистентности к различным тяжелым металлам в составе базы данных MetGenes
Table 1. Number of genes for resistance to various heavy metals in the MetGenes database

Тяжелый металл / Heavy metal	Количество генов резистентности / Number of resistance genes
Мышьяк (As)	309
Цинк (Zn)	2061
Никель (Ni)	392
Теллур (Te)	353
Кобальт (Co)	228
Ртуть (Hg)	75
Кадмий (Cd)	48
Комплекс тяжелых металлов (heavy metal complex)	357
Другие (Other)	1302

Подготовительный этап

Конфигурация XML-файла с путями к FASTA-файлам и базе данных MetGenes.

Установление параметров поиска: минимальное сходство (90%), порог $e\text{-value}$ ($1e^{-5}$), минимальная идентичность (50%).

Идентификация открытых рамок считывания (ORFs)

Программа находит старт-кодоны (ATG, GTG, TTG) и стоп-кодоны (TAG, TAA, TGA).

Минимальная длина – 100 нуклеотидов, минимальная длина белка – 30 аминокислот.

Сравнение с базой данных MetGenes (BLASTX)

Использование BLASTX версии 2.12.0+ для выявления сходства аминокислотных последовательностей.

Отбор совпадений при проценте идентичности не менее 90% и длине совпадения не менее 30 аминокислот.

Генерация отчетов

Итоговый текстовый отчет включает список идентифицированных генов с указанием процента сходства, названия и функции гена.

Время анализа одного файла составляет 10–20 мин.

В 38 геномах *V. cholerae* nonO1/nonO139 было выявлено 44 гена устойчивости к ТМ, разделенных на 2 группы:

- конститутивные (14 генов) – присутствовали во всех исследованных штаммах (например, *zinc ribbon-containing protein*, *zinc ABC transporter*, *tellurite resistance protein*, *terC/als*);
- вариабельные – обнаруживались лишь в отдельных изолятах (например, *acr3 family arsenite efflux transporter*, *ArsR/SmtB*).

Ген *acr3* обнаружен в 12 штаммах 2024 г. (1 клинический, 11 из объектов окружающей среды), но отсутствовал в изолятах 2023 г. Ген *czcC*, кодирующий компонент системы CzcCBA, был найден в 4 штаммах 2023 г., но не выявлен в выборке 2024 г. [22]. К данной группе относится ген *ACR3 family arsenite efflux transporter*, опосредующий эффлюкс – арсенит-протонный обмен, выбрасывая ионы арсенита из

Таблица 2. Распределение штаммов по году выделения и серогруппе
 Table 2. Distribution of strains by year of isolation and serogroup

№ п/п	Год исследования / Year of study	Число выделенных штаммов / Number of isolated strains	Серогруппы (число штаммов данной серогруппы) / Serogroups (number of strains of a given serogroup)
1	2023	14	O49 (3), O159-like (2), O40-like (1), O5 (1), O2 (1), O162 (1), O136 (2), O79-like (1), O4 (1), O43-like (1)
2	2024	24	O119 (1), O198 (1), O207-like (3), O23 (3), O52 (2), O39 (2), O51-like (3), O157 (1), O136 (2), O8 (3), O19 (1), O2 (1), O94-like (1)

клетки [23]. Данный ген был обнаружен в 12 штаммах 2024 г., включая 1 клинический и 11 из ООС. При этом среди изученных культур, выделенных в 2023 г., данный ген нами обнаружен не был.

Устойчивость к мышьяку у бактерий, как правило, обеспечивается хромосомными или плазмидными оперонами *ars*, контролируемые транскрипционными репрессорами семейства *arsR/smtB* [24, 25]. В настоящем исследовании белок UPI001EEC9B59 (*arsR/smtB*) был выявлен во всех штаммах 2023 и 2024 гг., что подтверждает его значение как ключевого регулятора. В то же время ген *UPI0011D53CBA*, кодирующий металлорегулятор семейства *arsR/smtB*, был обнаружен лишь в 2 штаммах 2023 г. из ООС. Данные белки играют важную роль в регуляции экспрессии генов детоксикации, активируя их при повышенных концентрациях металлов и обеспечивая адаптацию клеток к токсическим условиям [26].

Наиболее распространенными серогруппами у НАГ-вибрионов в 2023 г. были: O49, O159-like, O40-like, O136, O162. В то же время серогруппа O49 встречалась у ряда штаммов, что может свидетельствовать о ее более широкой циркуляции среди НАГ-вибрионов.

Среди конститутивных генов особое значение имеет *arsR/smtB*, присутствие которого во всех геномах указывает на его эволюционное закрепление как универсального механизма резистентности к мышьяку. В изученных штаммах этот белок отсутствует, что может быть связано с использованием альтернативных механизмов эффлюкса ионов мышьяка [11, 27].

Белок семейства CzcC (ген *D0IJL8*), являющийся компонентом системы CzcCBA, был обнаружен в 4 штаммах 2023 г. (1 клинический, 3 из ООС), однако отсутствовал в изолятах 2024 г.

Сравнение серогрупп показало, что в 2023 г. наиболее распространенной была O49, наряду с O159-like, O40-like, O136 и O162. В 2024 г. доминировали серогруппы O119, O198, O207-like, O23 и O52; при этом некоторые серогруппы (O136, O23, O207-like) встречались в оба периода (табл. 2). Присутствие белка UPI001EEC9B59 (*ArsR/SmtB*) во всех геномах исследованных штаммов подтверждает использование универсального механизма резистентности к мышьяку, тогда как выявление ACR3 и CzcC только в отдельных изолятах отражает вариабельность генетического репертуара и свидетельствует о существовании альтернативных адаптивных стратегий.

К числу ключевых белков штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 2024 г. выделения, связанных с устойчивостью к мышьяку, относились:

UPI001EEC9B59 (*ArsR/SmtB*) – металлорегулятор, выявленный во всех исследованных штаммах, что еще раз под-

тверждает его фундаментальное значение в механизмах адаптации к ионам мышьяка;

UPI0018F069ED (ACR3 family arsenite efflux transporter) – транспортер, обнаруженный в 12 штаммах НАГ-вибрионов (1 клиническом и 11 из ООС), тогда как среди изолятов 2023 г. он отсутствовал. Эта особенность может свидетельствовать о привлечении альтернативных механизмов выведения мышьяка у штаммов более ранней изоляции.

Наличие ACR3 у значительной части изолятов 2024 г. указывает на функционирование дополнительного механизма активного эффлюкса арсенита, что потенциально усиливает устойчивость данных штаммов к мышьяку. При этом *ArsR/SmtB* оставался ключевым регулятором устойчивости как для изолятов 2023 г., так и для штаммов следующего года (рисунок).

Для оценки эффективности созданной базы данных был проведен сравнительный анализ с использованием существующих ресурсов. Использование AMRFinder позволило выявить исключительно гены, связанные с антибиотикорезистентностью; детерминанты устойчивости к ТМ в исследованных штаммах обнаружены не были. В свою очередь, VacMet обеспечивал идентификацию генов, связанных с металлорезистентностью, однако полученные результаты характеризовались низким уровнем идентичности ($\leq 50\%$) и отсутствием возможности фильтрации по виду, что усложня-

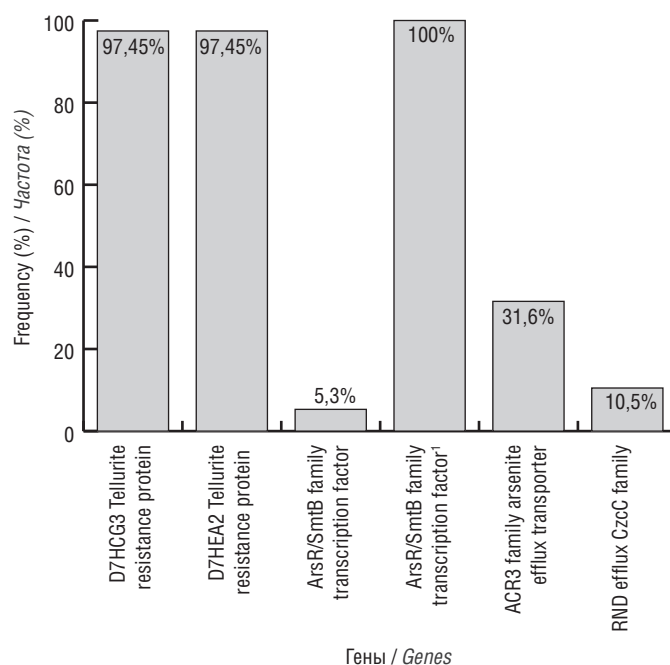


Рисунок. Суммарное распределение генов устойчивости к ТМ у *V. cholerae* в 2023–2024 гг.
 Figure. Total distribution of TM resistance genes in *V. cholerae* in 2023–2024.

ло интерпретацию данных. Кроме того, формат выходных таблиц требовал дополнительной обработки для корректного выделения информации.

Таким образом, AMRFinder продемонстрировал высокую надежность в отношении антибиотикорезистентности, но оказался неприменимым для анализа металлорезистентности. Напротив, VacMet позволил выявить соответствующие гены, однако ограниченные функциональные возможности и низкие показатели идентичности существенно осложняют их интерпретацию. Тем не менее именно с помощью VacMet удалось зафиксировать у исследованных штаммов наличие детерминант, связанных с устойчивостью к ТМ, и выявить гены, связанные с лекарственной устойчивостью.

К числу конститутивных генов мы отнесли те, которые выявлялись во всех исследованных геномах. Эти детерминанты формируют основу генетического профиля устойчивости и обеспечивают базовый уровень адаптации микроорганизма к неблагоприятным условиям. Их постоянное присутствие указывает на эволюционное значение данных генов как ключевых элементов персистенции холерного вибриона в природных водоемах, а также на их возможную роль в долговременном сохранении популяции и поддержании экологической стабильности возбудителя.

К данной группе относились:

- BAC0425|vexD|trIQ9KR85|Q9KR85_VIBCH – транспортер семейства AcrB/D/F, обеспечивающий удаление токсичных веществ из клетки;
- BAC0528|vexC|trIQ9KR86|Q9KR86_VIBCH – предполагаемый периплазматический белок, участвующий в переносе молекул;
- BAC0427|vexF|trIA6P7H3|A6P7H3_VIBCL – транспортер множественной лекарственной устойчивости;
- BAC0423|vcrM|trIF8RKZ1|F8RKZ1_VIBCL – белок VcrM, участвующий в ответе на химический стресс;
- BAC0422|vcmA|splQ9KRU4|INORM_VIBCH – белок NorM, обеспечивающий выведение антибиотиков.

В отличие от этого стабильного набора, переменные гены встречались только у отдельных изолятов *V. cholerae* nonO1/nonO139, что отражает их генетическую гетерогенность и способность к формированию уникальных адаптивных стратегий. Данная группа включает:

- BAC0534|emrD-3|trIA5EYZ6|A5EYZ6_VIBC3 – ген, связанный с устойчивостью к многокомпонентным антибиотикам;
- BAC0421|vceR|trIQ9KS52|Q9KS52_VIBCH – регулятор устойчивости к тетрациклину;
- BAC0159|fabV|splQ9KRA3|Y1738_VIBCH – ген, участвующий в синтезе жирных кислот, что может косвенно способствовать развитию резистентности.

Таким образом, конститутивные гены представляют собой «базовый пул» резистентности, обеспечивающий сохранение устойчивости во всех штаммах, тогда как переменные детерминанты отражают индивидуальные особенности отдельных изолятов и могут способствовать расширению спектра адаптивных возможностей популяции *V. cholerae*.

Выявленные гены преимущественно ассоциированы с транспортом различных ионов и формированием адаптивных ответов на внешние стрессовые воздействия, что подтверждает возможность существования у *V. cholerae* раз-

личных механизмов лекарственной устойчивости. Часть этих генов может представлять интерес в качестве перспективных мишеней для разработки новых антибактериальных препаратов, а также использоваться в диагностике резистентности. Полученные результаты демонстрируют выраженную генетическую гетерогенность исследованных геномов *V. cholerae* nonO1/nonO139 по детерминантам устойчивости к ТМ. Использование созданных программных инструментов в дальнейшем позволит расширить анализ штаммов различного происхождения и оценить динамику формирования металлорезистентности. Представленная работа является одной из первых системных попыток изучения генетических основ устойчивости *V. cholerae* к ТМ и формирует основу для последующих исследований в этом направлении.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования с помощью разработанного программного продукта установлено, что в клетках НАГ, циркулирующих в России, присутствует набор генов устойчивости к ТМ, которые опосредуют различные типы резистентности. Эти данные могут способствовать пониманию механизмов регуляции устойчивости холерного вибриона и его способности к выживанию в природных и антропогенно измененных экосистемах. С учетом большой распространенности НАГ и способности к передаче генов вибрионам серогруппы O1 дальнейшее изучение позволит оценить влияние выявленных генов на выживаемость *V. cholerae*, в т.ч. в условиях, моделирующих природные водоемы, загрязненные ТМ.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Вклад авторов

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Author contribution

All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Литература

1. Евтеев АВ, Водопьянов СО. Генетическая обусловленность устойчивости к тяжелым металлам и ее связь с антибиотикорезистентностью у микроорганизмов, в том числе у бактерий рода *Vibrio*. Бактериология. 2024;9(3):97-104. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-97-104

2. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecology. 2011;1-20.
3. Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River Estuary, China. BMC Microbiol. 2013 Sep 30;13:214. DOI: 10.1186/1471-2180-13-214
4. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D737-43. doi: 10.1093/nar/gkt1252
5. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. Sci Rep. 2021 Jun 16;11(1):12728. DOI: 10.1038/s41598-021-91456-0
6. Xu M, Wu J, Chen L. Virulence, antimicrobial and heavy metal tolerance, and genetic diversity of *Vibrio cholerae* recovered from commonly consumed freshwater fish. Environ Sci Pollut Res Int. 2019 Sep;26(26):27338-27352. DOI: 10.1007/s11356-019-05287-8
7. Fu H, Yu P, Liang W, Kan B, Peng X, Chen L. Virulence, Resistance, and Genomic Fingerprint Traits of *Vibrio cholerae* Isolated from 12 Species of Aquatic Products in Shanghai, China. Microb Drug Resist. 2020 Dec;26(12):1526-1539. DOI: 10.1089/mdr.2020.0269
8. Монахова ЕВ, Архангельская ИВ. Холерные вибрионы nonO1/nonO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;2:14-23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23
9. Носков АК, Кругликов ВД, Москвитина ЭА, Монахова ЕВ, Левченко ДА, Янович ЕГ, и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;1:43-51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51
10. Бородина ОВ, Водопьянов СО, Водопьянов АС, Олейников ИП, Чемисова ОС, Полева МВ. Изучение встречаемости гена холодового шока *csH1* у штаммов *Vibrio cholerae*, циркулирующих на территории Российской Федерации. Бактериология. 2021;6(3):22-23.
11. Saha RP, Samanta S, Patra S, Sarkar D, Saha A, Singh MK. Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR-SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment. Biometals. 2017 Aug;30(4):459-503. DOI: 10.1007/s10534-017-0020-3
12. Nesler A, DalCorso G, Fasani E, Manara A, Di Sansebastiano GP, Argese E, et al. Functional components of the bacterial CzcCBA efflux system reduce cadmium uptake and accumulation in transgenic tobacco plants. N Biotechnol. 2017 Mar 25;35:54-61. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.11.006
13. Rensing C, Pribyl T, Nies DH. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. J Bacteriol. 1997 Nov;179(22):6871-9. DOI: 10.1128/jb.179.22.6871-6879.1997
14. Nies DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1995 May;177(10):2707-12. DOI: 10.1128/jb.177.10.2707-2712.1995
15. Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. J Bacteriol. 2011 May;193(10):2381-7. DOI: 10.1128/JB.01323-10
16. Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, et al. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS One. 2010 May 5;5(5):e10433. DOI: 10.1371/journal.pone.0010433
17. Costa WF, Giambiagi-deMarval M, Laport MS. Antibiotic and Heavy Metal Susceptibility of Non-Cholera *Vibrio* Isolated from Marine Sponges and Sea Urchins: Could They Pose a Potential Risk to Public Health? Antibiotics (Basel). 2021 Dec 20;10(12):1561. DOI: 10.3390/antibiotics10121561
18. Su J, Zhang Y, Hu T, Ming H, Xie Y, Jin Y, et al. Prevalence, antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio* spp. isolated from the clam *Meretrix meretrix* at different ages in Geligang, Liaohe estuary in China. Frontiers in Marine Science. 2022;9:1071371. DOI: 10.3389/fmars.2022.1071371
19. Siamalube B, Ehinmitan E. *Vibrio cholerae*: Understanding a persistent pathogen in Sub-Saharan Africa and the East Mediterranean Region. Pathog Dis. 2025 Jan 30;83:ftaf004. DOI: 10.1093/femspd/ftaf004
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
21. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2017613695 Российская Федерация. SeqAnalyzer-программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *Vibrio cholerae*, определения кратности варьируемых тандемных повторов (VNTR) и выявления INDEL-маркеров: №2016662799: заявл. 24.11.2016: опубл. 24.03.2017. Водопьянов АС, Водопьянов СО, Писанов РВ, и др.; заявитель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.
22. Bhattacharjee H, Rosen BP. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In: Nies DH, Silver S, editors. Molecular Microbiology of Heavy Metals. Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2007;371-406.
23. Водопьянов СО, Евтеев АВ, Герасименко АА, Водопьянов АС, Ежова МИ, Меньшикова ЕА, и др. Комплексный генетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor, выделенных на территории Российской Федерации в 2023 г., на присутствие возможных детерминант персистенции. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2024;20(2):61-67.
24. Pennella MA, Giedroc DP. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. Biometals. 2005 Aug;18(4):413-28. DOI: 10.1007/s10534-005-3716-8
25. Xu C, Rosen BP. Metalloregulation of Soft Metal Resistance Pumps. In: Sarkar B. (eds). Metals and Genetics. Plenum Press, New York, 1999;5-19. DOI: 10.1007/978-1-4615-4723-5_2
26. Osman D, Cavet JS. Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. Nat Prod Rep. 2010 May;27(5):668-80. DOI: 10.1039/b906682a
27. Bueno E, Pinedo V, Shinde DD, Mateus A, Typas A, Savitski MM, et al. Transient Glycolytic Complexation of Arsenate Enhances Resistance in the Enteropathogen *Vibrio cholerae*. mBio. 2022 Oct 26;13(5): e0165422. DOI: 10.1128/mbio.01654-22

References

1. Evteev AV, Vodopyanov SO. Genetic Determinants of Heavy Metal Resistance and Its Relationship with Antimicrobial Resistance in Microorganisms, Including Bacteria of the Genus *Vibrio*. Bacteriology. 2024;9(3):97-104. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-97-104 (In Russian).
2. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecology. 2011;1-20.
3. Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, et al. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River Estuary, China. BMC Microbiol. 2013 Sep 30;13:214. DOI: 10.1186/1471-2180-13-214
4. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D737-43. doi: 10.1093/nar/gkt1252

5. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep*. 2021 Jun 16;11(1):12728. DOI: 10.1038/s41598-021-91456-0
6. Xu M, Wu J, Chen L. Virulence, antimicrobial and heavy metal tolerance, and genetic diversity of *Vibrio cholerae* recovered from commonly consumed freshwater fish. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 Sep;26(26):27338-27352. DOI: 10.1007/s11356-019-05287-8
7. Fu H, Yu P, Liang W, Kan B, Peng X, Chen L. Virulence, Resistance, and Genomic Fingerprint Traits of *Vibrio cholerae* Isolated from 12 Species of Aquatic Products in Shanghai, China. *Microb Drug Resist*. 2020 Dec;26(12):1526-1539. DOI: 10.1089/mdr.2020.0269
8. Monakhova EV, Arkhangel'skaya IV. Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups in etiology of acute intestinal infections: current situation in Russia and around the world. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;2:14-23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23 (In Russian).
9. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Monakhova EV, Levchenko DA, Yanovich EG, et al. Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;1:43-51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51 (In Russian).
10. Borodina OV, Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, Oleynikov IP, Chemisova OS, Poleeva MV. Study of the occurrence of the cold shock gene *csH1* in *Vibrio cholerae* strains circulating in the territory of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2021;6(3):22-23. (In Russian).
11. Saha RP, Samanta S, Patra S, Sarkar D, Saha A, Singh MK. Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR-SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment. *Biometals*. 2017 Aug;30(4):459-503. DOI: 10.1007/s10534-017-0020-3
12. Nesler A, DalCorso G, Fasani E, Manara A, Di Sansebastiano GP, Argese E, et al. Functional components of the bacterial CzcCBA efflux system reduce cadmium uptake and accumulation in transgenic tobacco plants. *N Biotechnol*. 2017 Mar 25;35:54-61. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.11.006
13. Rensing C, Pribyl T, Nies DH. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol*. 1997 Nov;179(22):6871-9. DOI: 10.1128/jb.179.22.6871-6879.1997
14. Nies DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995 May;177(10):2707-12. DOI: 10.1128/jb.177.10.2707-2712.1995
15. Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol*. 2011 May;193(10):2381-7. DOI: 10.1128/JB.01323-10
16. Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, et al. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One*. 2010 May 5;5(5):e10433. DOI: 10.1371/journal.pone.0010433
17. Costa WF, Giambiagi-deMarval M, Laport MS. Antibiotic and Heavy Metal Susceptibility of Non-Cholera *Vibrio* Isolated from Marine Sponges and Sea Urchins: Could They Pose a Potential Risk to Public Health? *Antibiotics (Basel)*. 2021 Dec 20;10(12):1561. DOI: 10.3390/antibiotics10121561
18. Su J, Zhang Y, Hu T, Ming H, Xie Y, Jin Y, et al. Prevalence, antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio* spp. isolated from the clam *Meretrix meretrix* at different ages in Geligang, Liaohe estuary in China. *Frontiers in Marine Science*. 2022;9:1071371. DOI: 10.3389/fmars.2022.1071371
19. Siamalube B, Ehinmitan E. *Vibrio cholerae*: Understanding a persistent pathogen in Sub-Saharan Africa and the East Mediterranean Region. *Pathog Dis*. 2025 Jan 30;83:ftaf004. DOI: 10.1093/femspd/ftaf004
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
21. Certificate of State Registration of Computer Program No 2017613695 Russian Federation. SeqAnalyzer – software for analyzing the results of whole-genome sequencing of *Vibrio cholerae*, determining the multiplicity of variable tandem repeats (VNTR) and identifying INDEL markers: No. 2016662799: declared. 24.11.2016: published. 24.03.2017. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Pisanov RV, et al.; applicant Federal State Institution of Healthcare "Rostov-on-Don Order of the Red Banner of Labor Anti-Plague Research Institute" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.
22. Bhattacharjee H, Rosen BP. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In: Nies DH, Silver S, editors. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2007;371-406.
23. Vodopyanov SO, Evteev AV, Gerasimenko AA, Vodopyanov AS, Ezhova MI, Menshikova EA, et al. Analysis of *V. cholerae* O1 EL TOR strains isolated on the territory of the Russian Federation in 2023 for the presence of possible determinants of persistence. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov*. 2024;20(2):61-67. (In Russian).
24. Pennella MA, Giedroc DP. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals*. 2005 Aug;18(4):413-28. DOI: 10.1007/s10534-005-3716-8
25. Xu C, Rosen BP. Metalloregulation of Soft Metal Resistance Pumps. In: Sarkar B. (eds). *Metals and Genetics*. Plenum Press, New York, 1999;5-19. DOI: 10.1007/978-1-4615-4723-5_2
26. Osman D, Cavet JS. Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Nat Prod Rep*. 2010 May;27(5):668-80. DOI: 10.1039/b906682a
27. Bueno E, Pinedo V, Shinde DD, Mateus A, Typas A, Savitski MM, et al. Transient Glycolytic Complexation of Arsenate Enhances Resistance in the Enteropathogen *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2022 Oct 26;13(5): e0165422. DOI: 10.1128/mbio.01654-22

Информация о соавторах:

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-4336-0439

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, и.о. заведующего лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Information about co-authors:

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of the Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Aleksey S. Vodopyanov, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Acting Head of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-7178-8021