

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ CRISPR-CAS СИСТЕМ
НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERA*E**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 243 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Сергутина Данила Александровича

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук _____ В.А. Богатырев

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук _____ О.В. Семякина-Глушковская

Научный консультант:

док. биол. наук _____ С.П. Заднова

Саратов 2025

Введение. Холера является особо опасной инфекцией, широко распространенной во многих странах Латинской Америки, Африки и Азии, на значительной части территории которых сформировались эндемичные очаги. Несмотря на отсутствие эндемичных очагов холеры в Российской Федерации, эта карантинная инфекция до сих пор остается одной из важнейших проблем для нашего здравоохранения, поскольку огромные международные миграционные процессы населения создали реальную основу для ее заноса в страну из зарубежных регионов.

На сегодняшний день неоспоримым является тот факт, что главный вклад в эволюцию прокариот вносит горизонтальный перенос генов. Между тем, приобретение нового чужеродного генетического материала в составе плазмид, бактериофагов (фагов), островов патогенности и т.д. может быть как позитивным, так и негативным или нейтральным. При этом у бактерий существуют механизмы как «поощряющие» приобретение генетической информации (конъюгация, рекомбинация, трансформация и др.), так и системы защиты, ограничивающие горизонтальный перенос (системы рестрикции-модификации, сахар-неспецифические нуклеазы, abortивная инфекция и др.). Так, в защите клеток от внедрения чужеродных нуклеиновых кислот участвует недавно обнаруженная CRISPR-Cas (от Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats и CRISPR-associated genes) система, впервые обнаруженная в 1987 году. В настоящее время она выявлена в секвенированных геномах 91,0 % архей и 45,0 % бактерий, в том числе и у холерного вибриона. Данная система включает CRISPR кассету, состоящую из множества коротких повторяющихся палиндромных последовательностей, чередующихся с уникальными участками – спейсерами, и прилегающие к ней CRISPR ассоциированные гены, кодирующие эффекторные Cas белки. CRISPR-Cas действует как адаптивная иммунная система, поскольку после попадания чужеродного генетического материала, она включает в состав CRISPR-кассеты участки ДНК в виде новых спейсеров, тем самым обеспечивая иммунитет к последующему воздействию фагов и плазмид. Этот новый

уникальный механизм «иммунитета» прокариот остается еще до конца не изученным и требует более детального рассмотрения, однако он активно используется в практической работе для редактирования генома. Несмотря на активное исследование CRISPR-Cas системы холерного вибриона, ее присутствие и структура в геноме токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории РФ и сопредельных стран, изучено не в полном объеме.

Цель работы: анализ CRISPR-CAS систем *Vibrio cholerae*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение присутствия и анализ CRISPR-Cas систем в геноме штаммов *V. cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров.
2. Изучение устойчивости нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор к литическому действию бактериофага Rostov M3.

Структура магистерской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 77 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика CRISPR-Cas систем *vibrio cholerae*, изучена структура систем, установлена зависимость устойчивости штаммов биовара Эль Тор к литическому действию бактериофага ROSTOV M3.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы 12 штаммов O1 серогруппы классического биовара (таблица 1) и 136 нетоксигенных (*ctxA-tcpA*⁺ и *ctxA-tcpA*⁻) штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории РФ и сопредельных стран (Украина, Туркменистан) из внешней среды и от больных ОКИ с 1972 по 2018 гг. Штаммы хранятся в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в лиофилизированном состоянии.

На первом этапе работы было проведено исследование штаммов *V. cholerae* O1 классического биовара. В ранее проведенной работе показано,

что данные штаммы имеют CRISPR-Cas систему, но её структура не изучена. В результате анализа установлено, что все исследованные штаммы содержат только CRISPR-Cas систему I-E типа, другие типы не обнаружены. При этом было выявлено, что у 10 штаммов (91 %) присутствует каноническая система I-E, включающая восемь генов (таблица 2). Исключение составил штамм *V. cholerae* M-41, у которого отсутствуют два гена.

Количество спейсеров в CRISPR кассете в изученных штаммах варьировало от 0 до 55. При этом примечательно, что спейсеры не обнаружены в штаммах *V. cholerae* Cairo48 и Cairo50, используемых для изготовления лицензированных холерных вакцин Dukoral и Shanchol, широко применяемых для вакцинации на эндемичных территориях. Утрата спейсеров в данных штаммах может быть результатом активного их использования в практической работе и культивировании в реакторах.

Таблица 1 – Структура CRISPR-Cas системы штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов МЗ	Чувствительность к фагу Ростов МЗ
M-41	I-E	<i>cas3, cse1, cse2, cas5, cas1, cas2</i>	41	-	н/и
Cairo 48	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2gr11, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	-	-	н/и
Cairo-50	I-E	<i>cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3, cas3hd</i>	-	-	н/и
M-695	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	45	-	н/и
569B	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	1	-	не лиз.
O395	I-E	<i>cas3, cse1, cse2, cas6e, cas7, cas5, cas1, cas2*</i> <i>cas3, cas8, cse2, cas6e, cas7, cas5, cas1, cas2**</i>	39	-	н/и

Окончание таблица 1

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов МЗ	Чувствительность к фагу Ростов МЗ
М-710	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	30	-	лиз.
М-801	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	32	-	лиз.
М-1654	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	26	-	лиз.
М-941	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2gr11, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	55	-	лиз.
М-714	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	39	-	н/и

Примечания: * – согласно данным *Kuninobu 2023*; ** – согласно данным *McDonald*

В результате исследования нуклеотидных последовательностей нетоксигенных штаммов биовара Эль Тор в геноме *ctxAB-tcpA*⁺ изолятов данная система не обнаружена, в то же время среди *ctxAB-tcpA*⁻ штаммов выявлено 35 изолятов, которые имели CRISPR-Cas систему 1 класса (таблица 2). Нуклеотидные последовательности полных геномов данных штаммов депонированы в базу данных VGARus.

Таблица 2 – Структура CRISPR-cas системы штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор и их чувствительность к фагу Ростов МЗ

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-cas системы	количество спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов МЗ	Чувствительность к фагу Ростов МЗ
Нетоксигенные <i>ctxA-tcpA</i> ⁺ штаммы					
М1395	–	–	–	–	лиз
56	–	–	–	–	лиз

Продолжение таблица 2

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество во спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов М3	Чувствительность к фагу Ростов М3
866	—	—	—	—	не лиз
85	—	—	—	—	лиз
P18778	—	—	—	—	не лиз
M1434	—	—	—	—	не лиз
M1436	—	—	—	—	не лиз
M-1504	—	—	—	—	не лиз
M1501	—	—	—	—	лиз
M-1518	—	—	—	—	лиз
M1540	—	—	—	—	не лиз
M-1524	—	—	—	—	не лиз
M1528	—	—	—	—	не лиз
2613	—	—	—	—	не лиз
2687	—	—	—	—	не лиз
124	—	—	—	—	не лиз
Нетоксигенные <i>ctxA-tcpA</i> - штаммы					
M-988	I-F_T	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	н/о	н/о	не лиз
M-658	I-F_T	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	1	—	не лиз
M-659	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	56	—	лиз
M-1114	I-E/I-F_T	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	13/0	+	не лиз
M-1115	I-E/I-F_T	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	13/1	+	не лиз
M-1394	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	44	—	лиз
M-1222	I-F_T	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	1	—	не лиз

Продолжение таблица 2

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество во спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов М3	Чувствительность к фагу Ростов М3
М-1320	III-B	<i>cmr1, cas10, cmr3, cmr4, cmr5, cmr6, csx23, cas6f</i>	24	—	не лиз
617	I-E/I-F/III-B	<i>cas1, cas3, cas8f, cas5, cas7, cas6f/ cas3, cas8e, cse2, cas6e, cas7, cas5, cas1, cas2/ cmr1, cas10, cmr3, cmr4, cmr5, cmr6</i>	80/26/25	—	не лиз
М1337	I-E	<i>cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8e, cas3</i>	1	—	не лиз
М-1388	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	13/1	—	не лиз
М-1389	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	13/1	—	не лиз
М-1411	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	1	—	не лиз
М-1413	I-C/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ tniQ, cas8f, csy3, cas6f</i>	40/2	—	лиз
М-1426	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	0	—	не лиз
М-1428	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	44	—	не лиз
М-1431	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	60	—	лиз
102	I-F	<i>cas1, cas3, cas8f, cas5, cas7, cas6f</i>	49	+	не лиз

Продолжение таблица 2

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество в спейсерах	Спейсеры к фагу Ростов М3	Чувствительность к фагу Ростов М3
M-1441	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	48	—	лиз
M-1443	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	58	—	лиз
M-1444	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	76	—	лиз
M-1447	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas5f, cas8f, cas3-cas2, cas1</i>	15	—	лиз
M-1450	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	1	—	не лиз
M1457	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas5f, cas8f, cas3-cas2, cas1</i>	42	—	
M-1460	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	14/1	+	не лиз
2403	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	2/0	—	не лиз
M-1486	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	29/1	—	не лиз
M-1487	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	15/0	+	не лиз
M1516	I-C/I-F	<i>cas8c, cas7, cas4, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas5f, cas8f, cas3-cas2, cas1</i>	58/54	+	не лиз
M1517	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	23/1	+	не лиз
M-1525	I-F	<i>cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	1	—	не лиз

Окончание таблица 2

Обозначение штамма	Тип CRISPR-Cas системы	Структура CRISPR-Cas системы	Количество спейсеров	Спейсеры к фагу Ростов М3	Чувствительность к фагу Ростов М3
M1526	I-C/I-F	<i>cas8c, cas7, cas4, cas1, cas2/ cas6f, cas7f, cas5f, cas8f, cas3-cas2, cas1</i>	58/54	—	не лиз
29	I-E	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2</i>	7	—	лиз
M-1543	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2 cas6f, cas7f, cas8f, tniQ</i>	29/1	—	не лиз
136	I-E/I-F	<i>cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2/ tnsB, tnsC, cas6f, csy3, cas8f, tniQ</i>	8/3	—	не лиз

Примечания: «←» – ген(ы) не обнаружен(ы); лиз. – штамм лизируется фагом.

В ходе дальнейшего анализа установлено наличие двух типов данной системы – I и III. Тип I был представлен несколькими подтипами (I-E, I-F, I-Fmini, I-C), а тип III – одним III-B (таблица 2). У наибольшего количества штаммов (20) выявлена CRISPR-Cas система подтипа I-E, среди которых 10 изолятов имели только данный подтип, в остальных присутствовала еще одна дополнительная система. Исключение составил штамм *V. cholerae* 617, который кроме I-E имел две системы (таблица 2). Стоит отметить, что структура системы I-E у всех штаммов была канонической и состояла из 8-ми *cas* генов (*cas3, cas8e, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1, cas2*) (рисунок 1, а). Полученные нами данные подтверждают ранее полученные сведения при анализе штаммов, циркулирующих на эндемичной территории, о широком распространении системы I-E среди нетоксигенных штаммов холерного вибриона. Экспериментально доказано, что стабильное сохранение структуры

CRISPR-Cas системы I-E типа как среди штаммов *V. cholerae* O1 классического биовара, так и биовара Эль Тор обусловлено ее расположением на геномном острове GI-24, и перенос её в другие штаммы происходит только в составе указанного мобильного генетического элемента.

Три штамма – *V. cholerae* M1413, M1516, M1526 включали подтип I-C (таблица 4, рисунок 1, в). Пять штаммов (*V. cholerae* 617, 102, M1457, M1516, M1526) содержали полноценную CRISPR-Cas систему I-F подтипа с 6-ю *cas* генами (*cas1*, *cas3*, *cas8f*, *cas5*, *cas7*, *cas6f*) (таблица 4, рисунок 1, с). Система I-F входит в состав недавно открытого острова патогенности VPI-6 (*Vibrio* Pathogenicity Island), способного так же как GI-24 целиком вырезаться из хромосомы и переноситься в другие клетки.

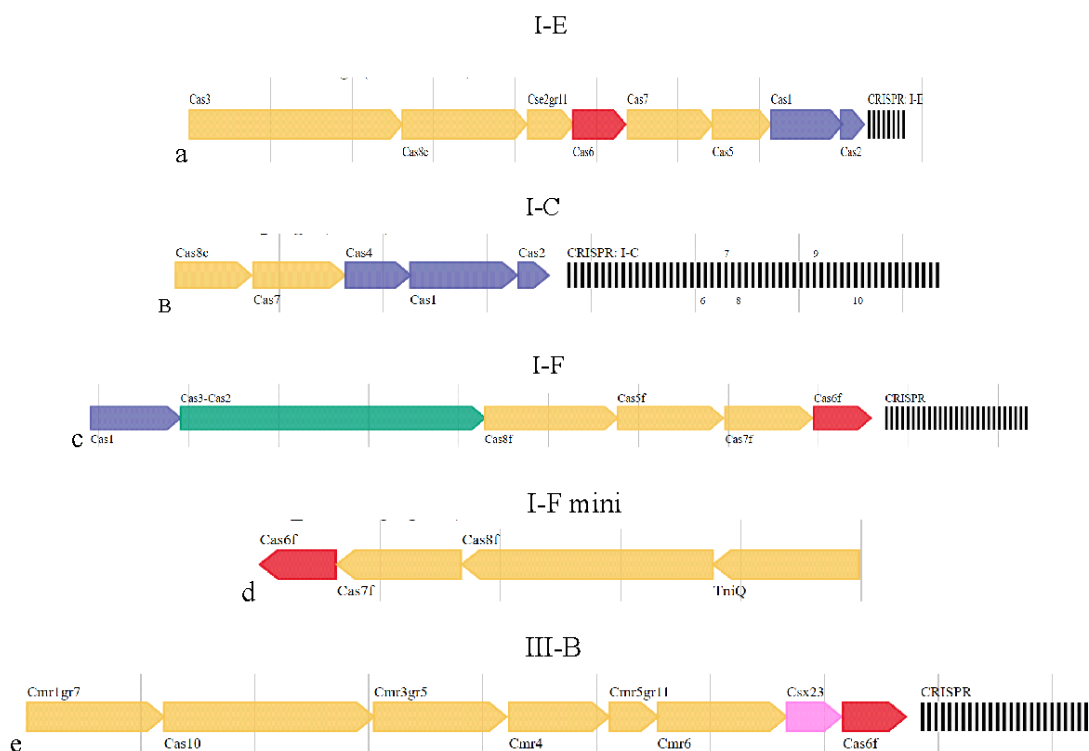


Рисунок 1 – Структура CRISPR-Cas систем изученных *ctxAB-tcpA*- штаммов

V. cholerae O1 Эль Тор. а – канонический подтип I-E, присутствующий в штамме *V. cholerae* 29; в - подтип I-C штамма *V. cholerae* M1526; с – подтип I-F штамма *V. cholerae* 617; d – подтип I-F mini штамма *V. cholerae* M1426; е – подтип III-B штамма *V. cholerae* M1320. Черными вертикальными линиями справа отмечены спейсеры (CRISPR).

У ряда штаммов присутствует усеченная I-F система (*cas6f*, *cas7f*, *cas8f*), состоящая из трех *cas* генов. Данная система обозначена нами как I-F mini (рисунок 1, d). В данной системе рядом с локусами *cas* генов расположен ген *tniQ*, ответственный за продукцию транспозазы. Согласно данным литературы подобные системы ассоциированы с Tn7 транспозоном, что подчеркивает роль горизонтального переноса в ее распространении. Учитывая отсутствие в данной системе гена *cas3*, кодирующего нуклеазу, можно предположить, что I-F mini является не функциональной.

Два штамма – *V. cholerae* M1320 и 617 имели тип III, подтип III-B (*cmr1*, *cas10*, *cmr3*, *cmr4*, *cmr5*, *cmr6*, *csx23*, *cas6f*) (таблица 4, рисунок 1, e).

При анализе CRISPR касеты установлено, что спейсеры присутствовали практически во всех системах, и их количество варьировало от 1 до 80, при этом наибольшее количество спейсеров обнаружено в системе I-E. Исключение составили четыре штамма, содержащие систему I-F mini, в которой спейсеры отсутствовали (таблица 4). У штамма M-988 из-за некачественной полногеномной нуклеотидной последовательности, представленной в GenBank, достоверно идентифицировать спейсеры не удалось. Выявленные спейсеры были подобны протоспейсерным последовательностям ДНК большого количества литических и умеренных фагов, а также плазмид и транспозона *V. cholerae* (фаги: O395, VPUSM 8, K139, K491, K571, K575, VcP032, Kappa, Rostov 7, X29, phi 2,). Кроме того, обнаружены спейсеры, гомологичные нуклеотидным последовательностям фагов и плазмид представителей рода *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. nigrapulchritudo*, *V. metschnikovii*), а так же неродственных видов бактерий (*Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Shigella*, *Shewanella algae*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*). Стоит отметить наличие в некоторых штаммах (*V. cholerae* V. *cholerae* 102, M1428, M1431, M1443, M1444, M1457, M1460, M1486) спейсеров, идентичных участкам ДНК фага ICP1 (самый распространенный на эндемичных территориях бактериофаг), выделенного в разные годы в Демократической

Республике Конго и Бангладеш. Поскольку новые спейсеры внедряются в 5'-области системы, CRISPR представляет собой хронологическую запись взаимодействия бактерии с мобильными генетическими элементами. В связи с этим, наличие у ряда штаммов спейсеров, гомологичных генетическому материалу фагу ICP1, может указывать на завозной характер данных штаммов. Также очевидно, что защищая *V. cholerae* от хищничества холерными фагами, а также фагами других бактерий CRISPR-Cas система повышает выживаемость нетоксигенных штаммов во внешней среде. Возможно, ее присутствие является одним из механизмов длительной циркуляции нетоксигенных штаммов в воде открытых водоемов.

Выявлено, что нетоксигенные *ctxA-tcpA*-штаммы с CRISPR-Cas системой распространены в РФ достаточно широко. Данные штаммы выделялись в разные годы на территории таких республик как Татарстан, Дагестан, Башкирия, Мордовия, Калмыкия, а также Астраханской, Саратовской областях и Пермском крае (таблица 2 и 4), что свидетельствует об их экологической устойчивости, возможно, связанной с наличием антифаговых механизмов.

Определение чувствительности штаммов V. cholerae O1 Эль Тор к бактериофагу Rostov M3. Выявление CRISPR-Cas систем в геноме нетоксигенных штаммов ставит вопрос об их участии в обеспечении устойчивости к холерным литическим фагам. Для проверки данного предположения была изучена чувствительность взятых в исследование штаммов к фагу Rostov M3, спейсеры к которому выявлены в некоторых штаммах (таблица 4). Фаг Rostov M3 выделен из внешней среды на территории г. Ростов-на Дону. Полная нуклеотидная последовательность данного фага представлена в GenBank (MN379460-MN379463). Стоит отметить, что спейсеры к данному фагу обнаружены в штаммах, выделенных из внешней среды в Калмыкии (M1517, M1516), Татарстане (M1487, M1460), а также от больных ОКИ в Мордовии (M1115, M1114) и Украине (102). Полученные данные могут указывать, что фаг Rostov M3 распространен достаточно широко.

При анализе фагочувствительности установлено, что все 7 штаммов, у которых были обнаружены спейсеры к фагу Rostov M3, не лизировались данным фагом. Полученные данные могут указывать на участие CRISPR-Cas системы в процессе фагоустойчивости.

Однако выявление большого количества фагоустойчивых изолятов как среди *ctxA-tcpA*⁺, так и среди *ctxA-tcpA*-штаммов указывает на присутствие других механизмов устойчивости к данному фагу, что указывает на необходимость продолжения исследований по анализу антифаговых систем в геноме нетоксигенных штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы выявило значительные различия в структуре CRISPR-Cas систем между классическим биоваром и биоваром Эль Тор. У классических штаммов присутствует система I-E типа с каноническим набором *cas*-генов, тогда как у штаммов Эль Тор наблюдается большее разнообразие, включая системы I-F, I-Fmini, I-C и III-B.

Отсутствие CRISPR-Cas у *ctxA-tcpA*⁺ штаммов, но их устойчивость к фагу Rostov M3, могут отражать эволюционную стратегию, направленную на борьбу с литическими фагами за счет других механизмов (рестрикции-модификации, CBASS системы). Напротив, наличие CRISPR-Cas у *ctxA-tcpA*-штаммов, особенно в сочетании с гомологичными фагу спейсерами, коррелирует с устойчивостью к фагу. Так установлено, что 20% штаммов, содержащих CRISPR-Cas систему и специфические спейсеры, проявляют устойчивость к бактериофагу Rostov M3, что подтверждает роль этих систем в антифаговой защите.

Распространение систем I-E и I-F на мобильных генетических элементах (GI-24 и VPI-6) подчеркивает роль горизонтального переноса в их эволюции. Усеченная система I-F mini, ассоциированная с Tn7, может представлять собой переходную форму, приобретенную для быстрой адаптации к новым фагам.

Важно отметить, что нетоксигенные штаммы (*ctxA-tcpA*-) содержат CRISPR-Cas систему, что может быть связано с их адаптацией к условиям внешней среды. В тоже время её отсутствие в геноме *ctxA-tcpA*+ штаммов, так же как и у токсигенных *V. cholerae* O1 Эль Тор, еще раз подтверждает их эволюционную близость.

Таким образом, результаты исследования указывают на гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор по наличию CRISPR/Cas системы, что расширяет сведения об их генетической организации, а также подчеркивают эпидемиологическую значимость нетоксигенных штаммов *V. cholerae* и необходимость дальнейшего изучения механизмов их длительной циркуляции во внешней среде. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых подходов к мониторингу и контролю инфекции, включая применение фаговой терапии и CRISPR-технологий. Для более полного понимания механизмов устойчивости целесообразно провести дополнительные исследования с расширенной коллекцией штаммов и другими модельными фагами.

ВЫВОДЫ

1. При анализе штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического биовара, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», показано присутствие в их геноме только канонической CRISPR-Cas системы I-E типа.
2. Нетоксигенные *ctxAB-tcpA*- штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор отличаются большим разнообразием CRISPR-Cas системы и включают разные ее типы и подтипы (I-E, I-F, I-Fmini, I-C, III-B). При этом большая часть изученных штаммов (57 %) содержит I-E систему, структура которой идентична штаммам классического биовара. Выявление нескольких типов и подтипов CRISPR-Cas системы в геноме ряда штаммов может указывать на её неоднократное приобретение данными изолятами посредством горизонтального переноса.

3. Определена связь между наличием CRISPR-Cas системы и устойчивостью к холерным фагам. Установлено, что 20 % штаммов, обладающих CRISPR-Cas системой и содержащих спейсеры к фагу Rostov M3, проявляют резистентность к нему.
4. Выявление спейсеров, гомологичных протоспейсерным последовательностям ДНК холерных фагов, циркулирующих на эндемичной территории, позволяет выявлять завозные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.