

DESULFOVIBRIO ИЗ МИКРОБИОТЫ ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА СВЯЗЫВАЮТ ЖЕЛЕЗО В МАЛОРАСТВОРИМЫЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СУЛЬФИДЫ

© 2021 г. О. П. Иккерт^а, М. В. Иванов^а, А. Ухова^а, В. С. Зюсман^а,
Л. Б. Глухова^а, М. Р. Авакян^а, О. В. Карначук^а, *

^аКафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики,
Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 16.11.2020 г.

После доработки 21.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Одной из групп бактерий, присутствующих в кишечнике детей с расстройством аутистического спектра (РАС) в повышенном количестве, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) рода *Desulfovibrio*. До настоящего времени, высокая концентрация *Desulfovibrio* у индивидуумов с РАС была показана только молекулярными методами. Культивируемые формы, выделенные из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) аутистов, до сих пор отсутствовали. Возможным механизмом влияния СРБ является перевод железа в бионедоступные формы сульфидов, вызывая его дефицит в организме. В этом исследовании мы выделили две чистые культуры *Desulfovibrio* из фекалий детей с диагностированным РАС. В экспериментах *Desulfovibrio desulfuricans* AY5 образовывал кристаллические сульфиды железа — грейгит и пирит, содержащие железо в бионедоступной форме.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, расстройства аутистического спектра, *Desulfovibrio*, биоминерализация железа, грейгит, пирит

DOI: 10.31857/S0026365621020051

Исследования последних лет свидетельствуют о существовании оси кишечник–мозг и вовлеченности микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в этиологию расстройств аутистического спектра (РАС) у детей (обзор см. *Wazawa et al., 2020*). Последние исследования показали эффективность трансплантации фекальной микробиоты в терапии РАС (*Kang et al., 2020*). Одной из групп бактерий, повышенную численность которых обнаруживают у детей с РАС, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) рода *Desulfovibrio* (*Finegold, 2011; Finegold et al., 2012; De Angelis et al., 2013; Weston et al., 2015; Liu et al., 2019*). Более того, была отмечена корреляция между численностью *Desulfovibrio* и интенсивностью проявлений РАС (*Tomova et al., 2015*). Современные биоинформатические исследования показали связь численности *Desulfovibrio* в кишечнике с биополярными нарушениями у детей (*Cheng et al., 2020*). Однако возможные механизмы, связывающие численность этой группы с патофизиологией, остаются неясными. В качестве гипотез рассматривают токсичное действие образующегося бактериями сероводорода, образование липополисахаридов и возможное участие в вос-

палительных процессах (*Weston et al., 2015*). Мы предполагаем, что одним из возможных механизмов влияния СРБ может быть иммобилизация железа в бионедоступные формы. Недостаток железа является одной из известных характеристик пациентов с РАС. Повышенное содержание СРБ, включая *Desulfovibrio*, может приводить к биоминерализации железа в форме сульфидов в ЖКТ.

Эксперименты, направленные на прояснение возможной связи СРБ с патофизиологией РАС, затруднены отсутствием чистых культур. Нам не известны сообщения о культивируемых формах СРБ, выделенных из фекалий пациентов с РАС. В этом исследовании мы впервые выделили чистые культуры *Desulfovibrio* из микробиоты кишечника детей с РАС и оценили их способность выводить железо из раствора путем осаждения в малорастворимые сульфиды.

Для получения накопительных культур сульфидогенов были использованы фекалии детей возрастной группы от 7 до 13 лет с диагностированным РАС. При получении накопительных культур сульфидогенов использовали среду Видделя–Бака (WB) с лактатом в качестве донора электронов и добавлением растворов микроэле-

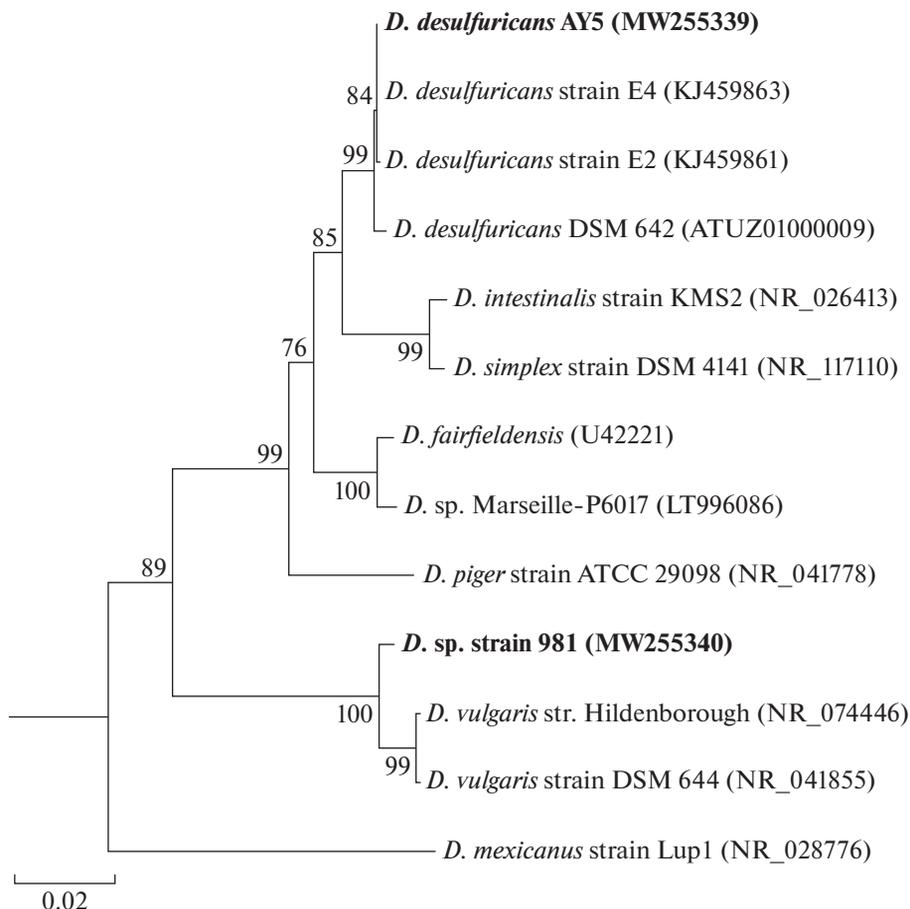


Рис. 1. Дерево, показывающее филогенетическое положение штаммов AY5 и 981 на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстрефы рассчитаны из 1000 итераций. Дерево построено с использованием MEGA X.

ментов, витаминов, селената-вольфрамата, сульфида натрия в качестве восстановителя (Widdel, Bak, 1992) и модифицированную добавлением элементарного железа (Карначук и соавт., 2006; Karnachuk et al., 2019). Инкубацию проводили в анаэробных условиях при температуре 37°C. Накопительные культуры, активно восстанавливающие сульфат, отбирали для получения колоний на агаризованной (1.5%) среде. После выделения колоний окончательную очистку культур проводили методом десятикратных разведений. В результате были выделены два морфологически однородных изолята, обозначенные штамм AY5 и штамм 981. Для определения филогенетического положения изолятов амплифицировали ген 16S рРНК с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации аналогичны описанным ранее (Frank et al., 2016). Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что оба штамма относятся к роду *Desulfovibrio* (рис. 1). Ближайшим валидно описанным родственником штамма AY5 является типовой штамм *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642, сход-

ство последовательностей гена 16S рРНК с которым составляло 99.72%. Штамм 981 был близок к другому модельному сульфатредуктору, *Desulfovibrio vulgaris*, со сходством последовательностей 99.02%.

Эксперименты по изучению иммобилизации железа *D. desulfuricans* AY5 были проведены в периодической культуре в сывороточных бутылках объемом 250 мл с использованием той же среды, что и для выделения чистых культур, и дополнительным внесением двухвалентного железа в концентрации 100 мг/л. Инкубировали пробы в течение 8, 24 и 32 сут при оптимальной температуре роста 37°C, после чего образованный осадок осаждали центрифугированием и проводили дифракционный анализ как описано ранее (Ikkert et al., 2013). В осадке, образованном штаммом AY5, обнаружили кристаллические сульфиды железа, грейгит (Fe_3S_4) и пирит (FeS_2) (рис. 2). Грейгит образовывался уже на 8-е сут, в то время как пирит обнаруживали только после 32 сут культивирования. Обе кристаллические фазы иммобилизуют желе-

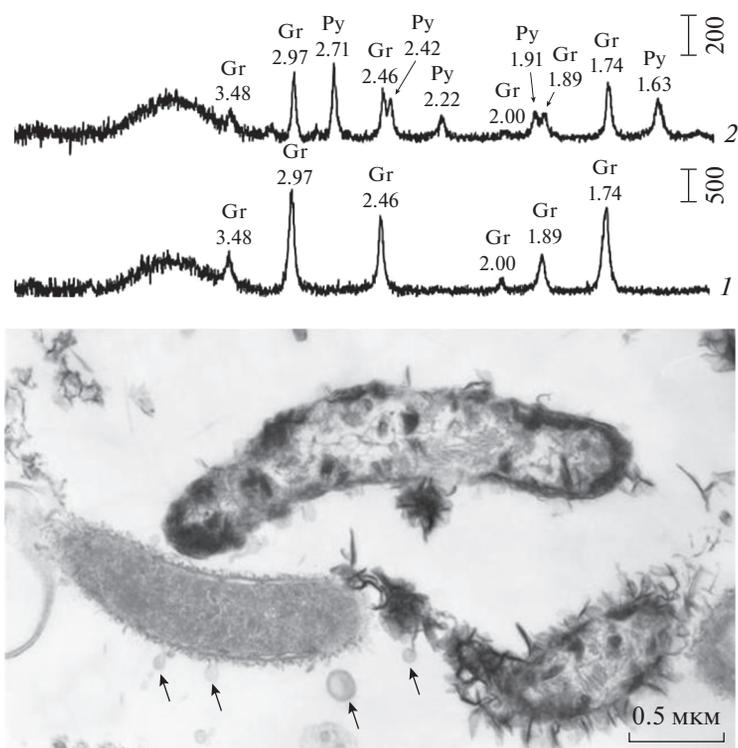


Рис. 2. Вверху: дифрактограммы осадка из эксперимента по биоминерализации железа штаммом *D. desulfuricans* AY5. Обозначения: 1 – инкубация в течение 24 сут; 2 – инкубация в течение 32 сут; Gr – грейгит, Fe_3S_4 ; Py – пирит, FeS_2 . Внизу: трансмиссионная электронная микрофотография ультратонких срезов клеток штамма AY5 с электронно-плотными кристаллами (предположительно, сульфида железа) на клеточной стенке и везикулах (показаны стрелками).

зо из раствора и с трудом подвержены ре-окислению. Исследование штамма AY5 показало присутствие микровезикул на клеточной стенке, которые могут выполнять роль дополнительных сайтов нуклеации микрокристаллов сульфидов (рис. 2). Дефицит железа является известной характеристикой аутистов (Yanagimoto et al., 2020). Выведение железа из раствора за счет связывания в трудно окисляемые кристаллические формы, хорошо известно для природных экосистем, например, осадков морей. Реакции образования кристаллических сульфидов железа могут происходить и в ЖКТ индивидуумов с РАС, аналогично тому, как это происходит в природе. Кроме того, микрокристаллы грейгита обладают магнитными свойствами и могут влиять на биологические структуры через образование магнитных полей. По последним данным магнитные поля ферромагнитных минералов оказывают влияние на ионные каналы в мембране и вызывают изменение структуры, функций и морфологии клеток (обзор см. Svobodova et al., 2019).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-34-70051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Родители детей, чьи фекалии были использованы для выделения СРБ, осведомлены о цели экспериментов и не возражают против проведения исследований, о чем имеется письменное согласие. Комитет по этике Томского государственного университета рассмотрел и утвердил проведение исследования (протокол № 38).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: О.П. Иккерт – эксперименты по биоминерализации, дифракционный анализ; М.В. Иванов – эксперименты по биоминерализации; А. Ухова – выделение и изучение чистой культуры; В.С. Зюсман – изучение чистой культуры; Л.Б. Глухова – выделение и амплификация ДНК; М.Р. Авакян – филогенетический анализ; О.В. Карначук – планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В. Распределение, разнообразие и активность сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гёк-гёль, Азербайджан // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 101–109.

- Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A., Puhakka J.A., Ivanov M.V. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 75. P. 82–89.
- Bezawada N., Phang T.H., Hold G.L., Hansen R. Autism spectrum disorder and the gut microbiota in children: a systematic review // *Ann. Nutr. Metab.* 2020. V. 76. P. 16–29.
- Cheng S., Han B., Ding M., Wen Y., Ma M., Zhang L., Qi X., Cheng B., Li P., Kafle O.P., Liang X., Liu L., Du Y., Zhao Y., Zhang F. Identifying psychiatric disorder-associated gut microbiota using microbiota-related gene set enrichment analysis // *Brief. Bioinform.* 2020. V. 21. P. 1016–1022.
- De Angelis M., Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Giacomo A., Serrazanetti D.I., Cristofori F., Guerzoni M.E., Gobetti M., Francavilla R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified // *PLoS One*. 2013. V. 8. e76993.
- Finegold S.M. *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism // *Med. Hypotheses*. 2011. V. 77. P. 270–274.
- Finegold S.M., Downes J., Summanen P.H. Microbiology of regressive autism // *Anaerobe*. 2012. V. 18. P. 260–262.
- Frank Y., Banks D., Avakian M., Antsiferov D., Kadychagov P., Karnachuk O. *Firmicutes* is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs, Western Siberia, Russia // *Geomicrobiol. J.* 2016. V. 33. P. 387–400.
- Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. Characterization of precipitates formed by H₂S-producing, Cu-resistant Firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 1221–1234.
- Kang D.-W., Adams J.B., Vargason T., Santiago M., Hahn J., Krajmalnik-Brown R. Distinct fecal and plasma metabolites in children with autism spectrum disorders and their modulation after microbiota transfer therapy // *mSphere*. 2020. V. 5. e00314-20.
- Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 1947–1959.
- Liu F., Li J., Wu F., Zheng H., Peng Q., Zhou H. Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: a systematic review // *Transl. Psychiatry*. 2019. V. 9. P. 1–43.
- Svobodova H., Kosnáč D., Tanila H., Wagner A., Trnka M., Vitovič P., Hlinkova J., Vavrinsky E., Ehrlich H., Polák Š., Kopani M. Iron-oxide minerals in the human tissues // *Bio-metals*. 2020. V. 33. P. 1–13.
- Tomova A., Husarova V., Lakatosova S., Bakos J., Vlkova B., Babinska K., Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia // *Physiol. Behav.* 2015. V. 138. P. 179–187.
- Weston B., Fogal B., Cook D., Dhurjati P. An agent-based modeling framework for evaluating hypotheses on risks for developing autism: Effects of the gut microbial environment // *Med. Hypotheses*. 2015. V. 84. P. 395–401.
- Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.
- Yanagimoto Y., Ishizaki Y., Kaneko K. Iron deficiency anemia, stunted growth, and developmental delay due to avoidant/restrictive food intake disorder by restricted eating in autism spectrum disorder // *Biopsychosoc. Med.* 2020. V. 14. P. 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s13030-020-00182-y>

A *Desulfovibrio* Isolate from the Microbiome of Children with Autistic Spectrum Disorders Immobilizes Iron in Poorly Soluble Crystalline Sulfides

O. P. Ikkert¹, M. V. Ivanov¹, A. Ukhova¹, V. S. Zuysman¹, L. B. Glukhova¹,
M. R. Avakyan¹, and O. V. Karnachuk^{1,*}

¹Department of Plant Physiology, Biotechnology, and Bioinformatics, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received November 16, 2020; revised November 21, 2020; accepted November 30, 2020

Abstract—Sulfate-reducing bacteria (SRB) of the genus *Desulfovibrio* are one of the groups occurring in elevated numbers in the gut of children with autistic spectrum disorders (ASD). Until now, high abundance of *Desulfovibrio* in individuals with RAS has been shown only by molecular methods. No cultured forms have been isolated from the gastrointestinal tract of autists. A conceivable mechanism of SRB effect is conversion of iron into biologically unavailable forms of sulfides, causing its deficiency in the organism. In this study we isolated two *Desulfovibrio* strains from feces of the children with diagnosed ASD. In experiments *Desulfovibrio desulfuricans* AY5 formed crystalline iron sulfides, greigite and pyrite, containing iron in a biologically unavailable form.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, autistic spectrum disorders, *Desulfovibrio*, iron biomineralization, greigite, pyrite