

УДК 637.1

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА ЗАКВАСОЧНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР ЛАКТОБАКТЕРИЙ**О.А. Глазунова¹, К.В. Моисеенко¹, А.В. Безунова², И.В. Рожкова², Т.В. Федорова¹**¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия² ФГАНУ Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия**Введение**

Многие люди страдают от метаболического синдрома, симптомы которого включают избыточный вес, ожирение, рост кровяного давления и содержания глюкозы в крови, а также некоторые другие маркеры риска развития атеросклероза. В связи с этим сегодня актуальным является создание новых продуктов питания функционального назначения с профилактической направленностью – способствующих улучшению здоровья при ежедневном их употреблении в составе рациона.

Уже долгое время молочнокислые бактерии (МКБ) изучаются как стартовые культуры для ферментации пищевых продуктов – биохимического процесса, который продлевает их срок хранения и повышает безопасность при сохранении и / или улучшении их основной пищевой ценности (Dimidi et al. 2019; Rakhmanova et al. 2018). Кроме того, в последнее время становится очевидным тот факт, что помимо повышения безопасности и пищевой ценности продуктов после ферментации, многие заквасочные штаммы, являясь пробиотиками, сами по себе способны оказывать благотворное влияние на здоровье. Ряд недавно открытых свойств пробиотиков, таких как укрепление кишечного барьера, выработка полезных ферментов (например, β -галактозидазы и гидролазы желчных солей), иммуномодулирующие и гипохолестеримические свойства, синтез нейромедиаторов и биоактивных пептидов (Markowiak and Śliżewska 2017), стимулирует поиск новых пробиотических штаммов и переоценку старых. В дополнение к этому, МКБ обладают сложной антагонистической системой, подавляющей рост многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В частности, важнейшими компонентами этой системы являются бактериоцины и антимикробные пептиды (Barzegari et al. 2020). Однако, наряду с вышеперечисленными полезными свойствами пробиотических штаммов, необходимо уделять внимание изучению безопасности их использования, одним из важнейших аспектов которой является антибиотикорезистентность. Многие микроорганизмы обладают врожденной устойчивостью к определенным классам антибиотиков (Cox and Wright 2013). Важной особенностью данного типа устойчивости является возможность ее передачи исключительно вертикально, то есть только от родительских клеток к клеткам-потомкам. Однако в случае пробиотических микроорганизмов она не представляет особой проблемы (Sharma et al. 2014). Более того, умеренная врожденная устойчивость некоторых пробиотических штаммов к антибиотикам позволяет использовать их для профилактики тяжелого дисбиоза, который может возникнуть при лечении инфекций данным типом препаратов. С другой стороны, устойчивость к антибиотикам, приобретенная микроорганизмом в результате горизонтального переноса генов (трансмиссивная устойчивость) представляет серьезную проблему для безопасного использования заквасочных и пробиотических штаммов, поскольку некоторые штаммы пробиотиков, несущие гены устойчивости к антибиотикам, могут передавать их микроорганизмам, вызывающим распространенные инфекции (Kumar, et al. 2020).

Целью настоящей работы являлось изучение гипохолестеримических и антагонистических свойств, а также установление профиля антибиотикорезистентности для семи коллекционных штаммов лактобактерий, секвенирование их геномов и идентификация ключевых генов, ответственных за функциональные свойства данных штаммов.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы МКБ из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ). Штаммы хранились в средах с добавлением 20 % глицерина при температуре -70°C . Для проведения исследований штаммы выращивали в жидких средах, чистоту суспензий проверяли микроскопически.

Устойчивость штаммов МКБ к антибиотикам оценивали диско-диффузионным методом. В чашки с MRS-агаром вносили 1 мл исходного посевного материала лактобактерий (10^8 КОЕ/мл), и в центр каждой чашки помещали диски с антибиотиками (DI-PLS-50-01, NISF, Санкт-Петербург, Россия). Чашки инкубировали в анаэробных условиях с использованием Oxoid AnaeroJar 2,5 л (Thermo Fisher Scientific, США) и кассеты GasPak (BD Biosciences, США) в течение 18–24 ч при 37 °C с последующим измерением диаметра зоны ингибирования.

Способность МКБ к деградации холестерина определяли в соответствии с МУ 2.3.2.2789 – 10, в питательной среде, оптимальной для данного вида МКБ, с добавлением 1,5 мМ холестерина. Культуры лактобактерий (10^9 КОЕ/мл) вносили в питательную среду в количестве 10 % об./об. Инкубирование проводили в микроаэрофильных условиях при 37 °C в течение 24 ч. После этого клетки осаждали центрифугированием при 4000 об./мин 30 мин, и определяли в супернатанте содержание холестерина методом ВЭЖХ с использованием колонки C18 (150 мм х 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила с водой в соотношении 90/10 (об./об.). Скорость подачи элюента 2 мл/мин. Концентрацию холестерина определяли при помощи калибровочного графика.

При изучении антимикробной активности штаммов МКБ в качестве тест-культур использовали штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* B-125; способность к подавлению роста тест-штаммов оценивали по размеру зоны ингибирования вокруг лунки с образцом ферментированного конкретным штаммом МКБ молока.

Для выделения ДНК штаммы молочнокислых бактерий статически культивировали в 20 мл MRS среды при температуре 37 ± 1 °C до появления видимой опалесценции. Примерно 0,1 мл бактериальных клеток отделяли центрифугированием при 4 °C и $10\,000 \times g$ в течение 5 мин. Полученные клетки обрабатывали 20 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) (Serva, Германия) и 5 мкл РНКазы А (2 мг/мл) (Fermentas, Германия) при 37 °C в течение 20 мин. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, США), согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной ДНК проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США).

Библиотеки ДНК получали с использованием набора Ion AmpliSeq 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и индексировали с помощью набора адаптеров (штрих-кодов) Ion Xpress 1–16 (Thermo Fisher Scientific, США). Качество и количество полученных ДНК-библиотек проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100. Секвенирование геномов проводили с использованием персональной геномной машины Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные прочтения были обработаны и собраны с помощью CLC Genomics Workbench 11.0 (Qiagen, США). После сборки аннотации геномов были выполнены с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, а также с использованием сервисов eggNOG, SignalP и SecretomeP (Табл. 1). Все геномы были депонированы в базу данных GenBank – BioProject: PRJNA736961.

Биоинформатический анализ генетических кластеров бактериоцинов в геномах лактобактерий, проводили с использованием сервиса BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/index.php>).

Таблица 1 – Краткая сводка данных по секвенированию и аннотированию геномов МКБ

Штаммы		Сборка контигов		Аннотация			
Наименование	16s рРНК	Контиги, шт.	N50, п.о.	Гены, шт.	CDS, шт.	Псевдо-гены, шт.	CRISPR, шт.
<i>L. helveticus</i> NK1	MT448799	307	19 479	2 214	1 771	374	2
<i>L. helveticus</i> H-9	MW558118	404	16 544	2 254	1 811	370	4
<i>L. lactis</i> dlA	MN994624	853	39 891	3 614	2 744	774	0
<i>L. delbrueckii</i> Lb100	MN994622	118	92 655	1 934	1 566	259	1
<i>S. thermophilus</i> 159	MN994626	76	100 972	1 914	1 607	246	2
<i>L. reuteri</i> LR1	MN994628	319	20 552	2 179	1 947	149	0
<i>L. rhamnosus</i> F	MN994629	66	144 365	2 763	2 607	85	1

Результаты и дискуссия

Определение устойчивости штаммов МКБ к различным классам антибиотиков. В работе был определен профиль устойчивости коллекционных штаммов лактобактерий к 15-и распространенным антибиотикам из восьми различных структурных семейств: ампициллин (Amp), амоксициллин (Amx), оксациллин (Oxa) и пенициллин G (PenG) из подсемейства пенициллинов (пенамов) семейства β -лактамов; фосфомицин (Fos) из семейства фосфомицинов; гентамицин (Gen), канамицин A (KanA) и неомицин (Neo) из семейства аминогликозидов; доксициклин (Dox) и тетрациклин (Tet) из семейства тетрациклинов; азитромицин (Azm) из семейства макролидов; линкомицин (Lcm) из семейства линкозамидов; хлорамфеникол (Chl) из семейства амфениколов; и левофлоксацин (Lev) и пефлоксацин (Pef) из семейства фторхинолонов. Результаты проведенных тестов антибиотикорезистентности приведены на рисунке 1. Наибольшую резистентность к выбранным антибиотикам проявлял штамм *L. rhamnosus* F. Данный микроорганизм был устойчив к девяти из 15 тестируемых антибиотиков. Наименьшую резистентность проявлял штамм *L. lactis* dIA, рост которого сильно подавлялся 10 антибиотиками, в то время как для остальных антибиотиков наблюдалась промежуточная устойчивость. Также в результате экспериментов была обнаружена вариабельность устойчивости к антибиотикам различных штаммов МКБ, относящихся к одному виду. Так, для штаммов *L. helveticus* NK1 и *L. helveticus* H-9 паттерны устойчивости к антибиотикам отличались по пяти антибиотикам из панели.

Чтобы определить, имеет ли наблюдаемая антибиотикорезистентность штаммов переносимый характер, геномы всех штаммов были проверены на наличие ряда генов антибиотикорезистентности (AR-генов). Отобранные гены включали те, для которых были ранее описаны как наличие у изучаемых видов лактобактерий, так и возможность горизонтального переноса. В качестве AR-генов устойчивости к аминогликозидам были выбраны гены модифицирующих их ферментов – бифункциональной аминогликозид N-ацетилтрансферазы/О-фосфотрансферазы AAC(6') – Ie-APH(2'') – Ia (aac(6') – aph(2'')) и аминогликозид-О-нуклеотидилтрансферазы ANT(6') – Ia (aad(E)); к тетрациклинам – гены рибосомных защитных белков (таких как, *tet(M)*, *tet(W)* и *tet(T)*) и гены протонных помп (*tet(K)* и *tet(L)*); к амфениколам – ген ацетилтрансферазы хлорамфеникола (*cat*); к MLS-антибиотикам – гены метилаз 23S рРНК (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)* и *erm(T)*) и ген протонной помпы (*mef(A)*). Проведенный анализ показал отсутствие всех проверяемых генов в изучаемых штаммах МКБ. Таким образом, с высокой вероятностью можно заключить, что наблюдаемая антибиотикорезистентность штаммов лактобактерий носит непередаваемый характер. Скорее всего, резистентность коллекционных штаммов носит “врожденный” характер и объясняется индивидуальными мутациями и уровнями экспрессии непередаваемых генов.

Гипохолестеринемическая активность штаммов лактобактерий. Гипохолестеринемическая активность штаммов исследуемых МКБ была оценена в процессе роста на среде, содержащей холестерин. Как видно из представленных в таблице 2 данных, способность лактобактерий к деградации холестерина является штамм-специфичной характеристикой. Наиболее активным штаммом из исследованных МКБ являлся *L. lactis* dIA (содержание холестерина в среде через 24 ч культивирования уменьшалось более чем на 60 %).

Таблица 2 – Убыль холестерина в среде культивирования в процессе роста штаммов МКБ

Штамм МКБ	Убыль холестерина, %
<i>L. helveticus</i> NK1	51,9
<i>L. helveticus</i> H-9	50,0
<i>L. lactis</i> dIA	61,0
<i>L. delbrueckii</i> Lb100	52,6
<i>S. thermophilus</i> 159	43,8
<i>L. reuteri</i> LR1	11,3
<i>L. rhamnosus</i> F	36,7

Анализ геномов показал, что все изученные штаммы МКБ обладали генами, потенциально участвующими в микробном метаболизме холестерина (Рис. 2). Однако гены гидролаз желчных кислот (BSH) были обнаружены только в пяти штаммах. Геномы *L. helveticus* Н-9 и *L. rhamnosus* F содержали по одному гену *bsh*, а геном *L. lactis* dIA – два. Потенциально данные штаммы МКБ могут обладать гипохолестеринемической активностью *in vivo*, что требует дальнейшего подтверждения в экспериментах на животных.

Штамм	Синтез клеточной стенки					Синтез белков										Синтез ДНК	
						30S					50S						
	MLS																
	β-лактамы		фосфомицины	аминогликозиды			тетрациклины		макролиды		линкозамиды		амфениколы		фторхинолоны		
	Amp	Amx		Oxa	PenG	Fos	Gen	KanA	Neo	Dox	Tet	Azm	Lcm	Chl	Lev	P	
L. helveticus NK1	13.0	8.0	10.0	11.5	13.5	12.5	7.5	11.5	9.0	10.0	14.5	18.5	12.0	9.0	10.0		
L. helveticus Н-9	24.0	10.0	17.5	18.0	14.5	16.5	15.5	9.5	10.0	9.5	16.5	15.0	9.5	7.5	16.0		
L. lactis dIA	29.5	31.0	10.0	11.5	10.0	25.0	25.5	26.5	20.0	28.0	19.0	33.0	29.0	20.0	11.0		
L. delbrueckii LB100	13.5	9.0	12.0	15.5	6.5	22.5	9.0	17.5	12.0	9.0	19.5	13.0	13.5	13.5	9.0		
S. thermophilus 159	14.5	10.0	11.0	14.5	17.5	15.0	9.0	16.5	16.0	13.0	14.5	12.0	24.5	11.0	19.0		
L. reuteri LR1	15.0	27.5	15.5	21.5	10.5	22.5	12.5	19.5	11.5	9.5	23.5	15.0	14.0	10.0	7.0		
L. rhamnosus F	9.5	9.0	10.5	10.0	10.0	12.0	13.5	12.5	12.0	7.5	9.5	8.0	9.5	10.0	7.0		

Рис. 1. Диаметр зоны задержки роста в мм: до 10 мм – резистентный (красный); с 11 до 20 мм – распознается как промежуточная резистентность (чувствительность); более 20 мм задержки роста – не резистентный (зеленый)



Штамм	Гены				
	BSH	ABC транспортер	Симпортер	PTS система	Холестерол редуктаза
<i>L. helveticus</i> NK1	0	Есть	Есть	Есть	Есть
<i>L. helveticus</i> Н-9	1	Есть	Есть	Есть	Есть
<i>L. lactis</i> dIA	2	Есть	Есть	Есть	Есть
<i>L. delbrueckii</i> Lb100	0	Есть	Нет	Есть	Есть
<i>S. thermophilus</i> 159	0	Есть	Нет	Есть	Есть
<i>L. reuteri</i> LR1	0	Есть	Есть	Есть	Есть
<i>L. rhamnosus</i> F	1	Есть	Есть	Есть	Есть

Рис. 2. Гены, потенциально участвующие в микробном метаболизме холестерина.

Антимикробная активность штаммов лактобактерий. Результаты изучения антимикробной активности штаммов МКБ в отношении тест-культур *S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* В-125 представлены в таблице 3. Все штаммы МКБ проявляли в разной степени антагонистическую активность. *In silico* анализ наличия генетических кластеров бактериоцинов в геномах лактобактерий представлен в таблице 4. У всех изучаемых штаммов были идентифицированы кластеры бактериоцинов, при этом у разных штаммов отличалось количество генетических кластеров, а также кодируемые ими классы бактериоцинов.

Таблица 3 – Антагонистическая активность штаммов МКБ

Штамм	Степень подавления, мм	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> B-125
<i>L. helveticus</i> NK1	11,5	10,5
<i>L. helveticus</i> H-9	11,0	10,0
<i>L. lactis</i> dIA	9,0	8,5
<i>L. delbrueckii</i> Lb100	11,7	9,8
<i>S. thermophilus</i> 159	15,0	10,5
<i>L. reuteri</i> LR1	9,5	11,0
<i>L. rhamnosus</i> F	10,5	11,5

Таблица 4 – Обнаруженные в геномах лактобактерий кластеры бактериоцинов

Штамм	GeneBank	Кластеры бактериоцинов (в скобках указан класс бактериоцина)
<i>L. helveticus</i> NK1	ASM1896708v1	Гельветицин J (III), Энтеролизин A (III)
<i>L. helveticus</i> H-9	ASM1896700v1	Энтеролизин A (III), Гельветицин J (III) – 2 кластера
<i>L. lactis</i> dIA		
<i>L. delbrueckii</i> Lb100	ASM1896701v1	Энтеролизин A (III)
<i>S. thermophilus</i> 159	ASM1896690v1	Лантипептид (I), Стрепид (не известно), Сактипептид (не известно), ComC (IIc)
<i>L. reuteri</i> LR1	ASM1896692v1	Энтеролизин A (III)
<i>L. rhamnosus</i> F	ASM1896689v1	Карноцин CP52 (IIa)

Заключение

Показано, что коллекционные штаммы лактобактерий не содержат AR генов и потому являются безопасными для использования в качестве заквасочных культур. При этом лактобактерии проявляют такие функциональные свойства, как антимикробные и гипохолестеринемические, что обусловлено наличием в их геномах соответствующих функциональных генов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2022–318 от «20» апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

- Markowiak, P. and Śliżewska, K. 2017. «Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health». *Nutrients*, 9, 1021. DOI:10.3390/nu9091021.
- Dimidi E, Cox S., Rossi M., and Whelan K. 2019. «Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease». *Nutrients* 11(8): 1806. DOI: 10.3390/nu11081806.
- Cox G. and Wright G.D. 2013. «Intrinsic Antibiotic Resistance: Mechanisms, Origins, Challenges and Solutions.» *Int. J. Med. Microbiol.* 303(6–7): 287–92. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Rakhmanova A., Khan Z.A. and Shah K. 2018. «A Mini Review Fermentation and Preservation: Role of Lactic Acid Bacteria». *MOJ Food Process. Technol.* 6(5): 414–17. DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00197.
- Barzegari, A., Kheyrolahzadeh, K., Khatibi, S.M.H., Sharifi, S., Memar, M.Y., & Vahed, S.Z. 2020. «The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms». *Infect. Drug Resist.* 13: 659–72. DOI: 10.2147/IDR.S232982.
- Sharma P., Tomar S.K., Goswami P., Sangwan V. and Singh R. 2014. «Antibiotic Resistance among Commercially Available Probiotics». *Food Res. Int.* 57: 176–95. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.025
- Kumar, S.B., Arnipalli S.R. and Ziouzenkova O. 2020. «Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance». *Antibiotics* 9(10): 688. DOI: 10.3390/antibiotics9100688.