

УДК 640

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *LACTICASEIBACILLUS PARACASEI*, ИЗ КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ И ТРАДИЦИОННОГО ЗЕРНОВОГО ПРОДУКТА ЮАР – МАХЕВУ**К.В. Моисеенко¹, А.В. Безунова², И.В. Рожкова², Т.В. Федорова¹**¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071, Россия²Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, 115093, Россия**Введение**

В настоящее время одним из перспективных и востребованных направлений современной пищевой биотехнологии является поиск новых штаммов молочнокислых бактерий для создания пробиотических препаратов и продуктов функционального питания [1]. Одним из основных компонентов стартерных культур для подобных продуктов и препаратов чаще всего являются бактерии рода *Lactobacillus* [2]. В связи с этим, выделение и изучение функциональных свойств новых штаммов этих микроорганизмов является актуальной и своевременной задачей.

Цель данной работы являлось выделение из кефирной закваски и национального ферментированного зернового продукта ЮАР – махеву (Mahewu), новых штаммов молочнокислых бактерий с последующей их биохимической характеризацией, оценкой безопасности и секвенированием геномов для дальнейшего биоинформатического поиска генов, имеющих потенциальное биотехнологическое значение (таких как кластеры бактериоцинов).

Материалы и методы

Выделение в чистую культуру. Используемые в данном исследовании штаммы *Lacticaseibacillus paracasei* KF1 и АВК были выделены нами ранее в чистую культуру из кефирного грибка [3]. Штаммы *L. paracasei* МА2 и МА3 выделены в чистую культуру из национального ферментированного зернового продукта ЮАР – махеву (Mahewu), используя ранее описанный протокол [3].

Для фенотипической идентификации и характеристики бактериальных изолятов проводили иммерсионную микроскопию на микроскопе Olympus BX50 (Япония). Биохимическую идентификацию и характеристику проводили с использованием тест-систем API 50CH («BioMérieux», Франция). Для подтверждения фенотипической и биохимической идентификации бактериальных изолятов проводили их 16S рРНК генотипирование. ПЦР амплификацию гена 16S рРНК проводили непосредственно с колонии, малая часть которой вносилась в ПЦР реакцию стерильным носиком пипетки. ПЦР реакция проводилась с использованием набора Taq ДНК-полимераза (Евроген, Россия) и стандартных праймеров: bak11w (5' – AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3') и bak4 (5' – AGG AGG TGA TCC ARC CGC A-3') [4]. ПЦР продукты выделяли из 2 % агарозного геля с использованием коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Секвенирование по Сангеру очищенных ПЦР продуктов осуществлялось с применением тех же праймеров что и для проведения ПЦР.

Определение антибиотикорезистентности. Антибиотикорезистентность бактериальных изолятов проводили методом дисковой диффузии в агар. Чашки с MRS агаром инокулировали 1 мл исследуемого изолята. В центр каждой чашки помещали пропитанные антибиотиками диски (ДИ-ПЛС-50–01, НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия). Чашки инкубировали в анаэробных условиях с использованием системы Oxoid AnaeroJar 2,5 л (Thermo Fisher Scientific, США) и кислород-удаляющих пакетов GasPak (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США) при 37 °C в течение 48 ч. Диаметр зоны ингибирования фиксировали как среднее арифметическое измерений в пяти различных направлениях.

Выделения ДНК. Для выделения ДНК штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) 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 относительном центробежном ускорении (ОЦУ, gcf) 10 000 × g в течение 5 мин. Полученные клетки обрабатывали 20 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) (Serva, Гейдельберг, Германия) и 5 мкл РНКазы А (2 мг/мл) (Fermentas, Сен-Леон-Рот, Германия) при 37 °C в течение 20 мин. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США), согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной ДНК проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Фостер-Сити, Калифорния, США) и флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

ПЦР определение наличия генов антибиотикорезистентности. Для проверки наличия генов антибиотикорезистентности использовали праймеры (13 пар), ранее описанные в Бегунова и др. [3]. Амплификацию с выделенной геномной ДНК проводили, используя набора Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Для проверки успешности ПЦР-амплификации, проводили электрофорез в 2 % агарозном геле.

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

Полученные прочтения были обработаны и собраны с помощью CLC Genomics Workbench 11.0 (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США). После сборки аннотации геномов были выполнены с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) [5]. Геномы были депонированы в GenBank под следующими номерами: *L. paracasei* MA2 – ASM1896698v1; *L. paracasei* MA3 – ASM2347065v1; *L. paracasei* KF1 – ASM2347064v1; *L. paracasei* ABK – ASM1896702v1. Поиск кластеров бактериоцинов в геномах осуществлялся с помощью Bagel 4 [6].

Результаты и дискуссия

Выделение в чистую культуру идентификация и биохимические характеристики. При изучении биохимических профилей с использованием тест-системы API 50CHL была проанализирована биохимическая активность выделенных штаммов с использованием набора из 49 субстратов и подтверждена их принадлежность к виду *L. paracasei* (Таблица 1). Установлено, что выделенные штаммы *L. paracasei* утилизируют достаточно большой спектр углеводных субстратов, включая такие моносахара как гексозы (глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза) и пентозы (рибоза); дисахариды (целлобиоза, мальтоза и др.), гликозиды (арбутин), глюкозиды (эскулин, салицин), многоатомные спирты (маннит) и N-ацетилглюкозамин. Отличительной особенностью штаммов *L. paracasei* MA2 и MA3, выделенных из зернового ферментированного продукта махеву, является способность к утилизации глицерина, сахарозы и 2-кетоглюконата калия, в отличие от кефирных штаммов *L. paracasei* KF1 и ABK, особенностью которых является способность к утилизации меллицитозы. Для штамма *L. paracasei* ABK характерна способность к утилизации D-мелибиозы.

Результаты секвенирования 16S рРНК гена подтвердили биохимическую идентификацию, отнеся все исследуемые штаммы к виду *L. paracasei*. Обнаруженная естественная биохимическая вариабельность исследуемых штаммов позволяет осуществлять направленный подбор штамма с конкретными известными биохимическими свойствами под ту или иную биотехнологическую задачу.

Проверка статуса антибиотикорезистентности. Многие микроорганизмы в силу своих структурных или функциональных особенностей обладают врожденной устойчивостью к определенным классам антибиотиков [7]. Данный тип устойчивости может передаваться только вертикально от родителей к потомству. Хотя врожденная устойчивость к антибиотикам может представлять серьезную опасность, если речь идет о патогенных и условно-патогенных микроорганизмах, в случае пробиотических микроорганизмов она не представляет особой проблемы [8]. Более того, умеренная врожденная антибиотикорезистентность некоторых пробиотических штаммов позволяет использовать их для профилактики тяжелых дисбиозов, возникающих при антибиотикотерапии инфекций. С другой стороны, устойчивость к антибиотикам, приобретенная микроорганизмами в результате горизонтального переноса генов – трансмиссивная устойчивость к антибиотикам – в настоящее время представляет серьезную проблему для безопасного использования пробиотических штаммов [9]. На сегодняшний день показано, что некоторые пробиотические штаммы, несущие гены устойчивости к антибиотикам, могут передавать их микроорганизмам, вызывающим распространенные внутрибольничные инфекции [10].

Как видно из Рисунка 1 антибиотикорезистентность исследуемых *Lactocaseibacillus* spp. значительно варьировала от штамма к штамму. Штаммы *L. paracasei* MA3 и KF1 обладали резистентностью к наибольшему числу различных антибиотиков – шести, только четыре из которых совпадали для обоих штаммов. Штамм *L. paracasei* MA2 был резистентен к трем антибиотикам, а штамм *L. paracasei* ABK – к пяти. Однако, если к остальным антибиотикам штамм MA2 проявлял промежуточную реакцию, то штамм ABK был не резистентен к шести из них.

Таблица 1 – Биохимические свойства изолятов лактобацилл: MA2 – *L. paracasei* MA2; MA3 – *L. paracasei* MA3; KF1 – *L. paracasei* KF1; и ABK – *L. paracasei* ABK.

Соединение	Биохимическая реакция				Соединение	Биохимическая реакция			
	MA2	MA3	KF1	ABK		MA2	MA3	KF1	ABK
Глицерин	+	+	–	–	Салицин	+	+	+	+
Эритрол	–	–	–	–	D-целлобиоза	+	+	+	+
D-арабиноза	–	–	–	–	D-мальтоза	+	+	+	+
L-арабиноза	–	–	–	–	D-лактоза	+	+	+	+
D-рибоза	+	+	+	+	D-мелибиоза	–	–	–	+
D-ксилоза	–	–	–	–	D-сахароза	+	+	–	–
L-ксилоза	–	–	–	–	D-трегалоза	+	+	+	+
D-адонитол	–	–	–	–	Инулин	–	–	–	–
Метил-βD-ксилапиранозид	–	–	–	–	D-мелецитоза	–	–	+	+
D-галактоза	+	+	+	+	D-раффиноза	–	–	–	–
D-глюкоза	+	+	+	+	Крахмал	–	–	–	–
D-фруктоза	+	+	+	+	Гликоген	–	–	–	–
D-манноза	+	+	+	+	Ксилит	–	–	–	–
L-сорбоза	–	–	–	–	Гентиобиоза	+	+	–	+
L-рамноза	–	–	–	–	D-тураноза	+	+	+	+
Дульцитол	–	–	–	–	D-ликсоза	–	–	–	–
Инозит	–	–	–	–	D-тагатоza	+	+	+	–
D-маннит	+	+	+	+	D-фукоза	–	–	–	–
D-сорбит	–	–	–	–	L-фукоза	–	–	–	–
Метил-αD-маннопиранозид	–	–	–	–	D-арабит	–	–	–	–
Метил-αD-глюкопиранозид	–	–	–	–	L-арабит	–	–	–	–
N-ацетилглюкозамин	+	+	+	+	Глюконат калия	–	–	–	–
Амигдалин	–	–	–	–	2-кетоглюконат калия	+	+	–	–
Арбутин	+	+	–	+	5-кетоглюконат калия	–	–	–	–
Эскулин, цитрат железа	+	+	–	+					

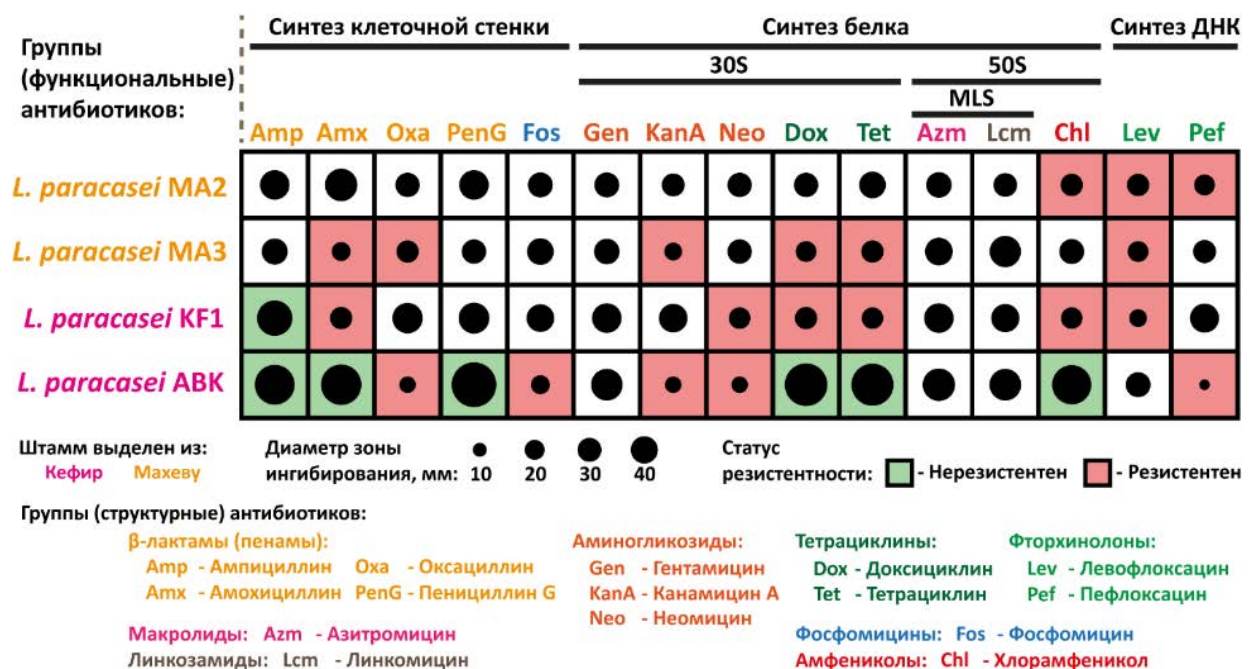


Рисунок 1 – Профиль антибиотикорезистентности выделенных штаммов лактобактерий

Проведенное ПЦР определение наличия генов антибиотикорезистентности показало отсутствие наиболее часто горизонтально-передающихся кишечными бактериями генов антибиотикорезистентности таких, как: гены устойчивости к аминогликозидам – *aac(6')* – *aph(2'')* и *aad(E)* [11]; гены устойчивости к тетрациклинам – *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(32)*, *tet(36)*, *tet(T)*, *tet(K)* и *tet(L)* [12]; ген устойчивости к амфениколам – *cat* [13]; гены устойчивости к макролидам-линкозамидам-стрептограминам (MLS) – *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(T)* и *mef(A)* [14].

Таким образом, с высокой вероятностью можно заключить, что наблюдаемая антибиотикорезистентность штаммов носит не передаваемый характер. Скорее всего резистентность выделенных штаммов носит “врожденный” характер и объясняется индивидуальными мутациями и уровнями экспрессии непередаваемых генов. Используя ранее предложенную схему оценки антибиотикорезистентности бактерий [9], все исследованные в данной работе штаммы можно считать приемлемыми для использования в качестве пробиотиков и заквасок.

Поиск кластеров бактериоцинов. Бактериоцины – бактериальные белки или пептиды, обладающие антимикробным действием, как правило, против близкородственных видов и родов бактерий, синтезируемые на рибосомах. В настоящее время они рассматриваются как факторы межмикробного антагонизма, обеспечивающие регуляцию популяции бактерий и колонизационную устойчивость организма человека и животных к патогенным микроорганизмам [15]. Известно, что многие микроорганизмы способны к синтезу бактериоцинов. Но бактериоцины молочнокислых бактерий представляют наибольший интерес с точки зрения применения их в качестве новых консервантов, их безвредность доказана многовековым применением молочнокислых бактерий при приготовлении разнообразных продуктов, прежде всего кисломолочных [16].

В результате поиска бактериоцинов в отсекарированных геномах четырех штаммов *L. paracasei* было установлено, что все штаммы *L. paracasei* содержали в своем геноме четыре кластера бактериоцинов: LSEI_2386, LSEI_2163, Бутиривибриоцин AR10 (Класс Pd), и Карноцин CP52 (Класс Па). Оба выделенных из махеву кефира штамма *L. paracasei* МА2 и МА3 характеризовались наличием кластера бактериоцина Ацидоцин А (Класс Па), отсутствовавшего у кефирных штаммов. В тоже время оба выделенные из кефира штамма *L. paracasei* KF1 и АВК содержали характеризовались наличием кластера бактериоцина Энтеролизин А (Класс П), отсутствовавшего у штаммов из махеву. Данная особенность может быть следствием континентальной разделенности ниш из которых были выделены соответствующие штаммы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант 22–16–00108.

Литература

1. Markowiak P. et al. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. // *Nutrients*. 2017. Vol. 9, № 9. P. 1021.
2. Shin S., Han N.S. Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals // *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals* / ed. Liang M. – T. Cham: Springer International Publishing, 2015. Vol. 27. 111–132 p.
3. Бегунова А.В. et al. Характеристика и функциональные свойства лактобацилл, выделенных из кефирных грибков // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Vol. 57, № 4. P. 362–373.
4. Dasen G. et al. Classification and Identification of Propionibacteria Based on Ribosomal RNA Genes and PCR // *Syst. Appl. Microbiol.* 1998. Vol. 21, № 2. P. 251–259.
5. Tatusova T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 14. P. 6614–6624.
6. Jong A. De et al. BAGEL : a web-based bacteriocin genome mining tool. 2006. Vol. 34. P. 273–279.
7. Cox G., Wright G.D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions // *Int. J. Med. Microbiol.* 2013. Vol. 303, № 6–7. P. 287–292.
8. Sharma P. et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics // *Food Res. Int.* 2014. Vol. 57. P. 176–195.
9. M. Álvarez-Cisneros Y., Ponce-Alquicira E. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria // *Antimicrobial Resistance – A Global Threat*. IntechOpen, 2019.
10. Kumar S.B., Arnipalli S.R., Ziouzenkova O. Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance // *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, № 10. P. 688.
11. Ammor M.S., Belén Flórez A., Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria // *Food Microbiol.* 2007. Vol. 24, № 6. P. 559–570.
12. Roberts M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 245, № 2. P. 195–203.
13. Schwarz S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. Vol. 28, № 5. P. 519–542.
14. Roberts M.C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. Vol. 282, № 2. P. 147–159.
15. Vuyst L. De, Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria : Production, Purification, and Food. 2007. P. 194–199.
16. Connor P.M.O. et al. ScienceDirect Antimicrobial antagonists against food pathogens : a bacteriocin perspective // *Curr. Opin. Food Sci.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 2. P. 51–57.