

<https://doi.org/10.17116/molgen201937031128>

## Биоинформатический анализ генома производственного штамма *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4

© А.Г. ТОЧИЛИНА, И.В. БЕЛОВА, И.В. СОЛОВЬЕВА, Т.П. ИВАНОВА, В.А. ЖИРНОВ

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, 603000

**Введение.** Штамм *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 в настоящее время широко используется для производства пробиотиков, биологически активных добавок к пище и продуктов питания. Это обуславливает актуальность исследования штамма с использованием современных молекулярно-генетических методов.

**Материал и методы.** Биохимические свойства штамма исследовали с использованием тест-системы API 50CHL («BioMerieux», Франция), секвенирование генома выполняли на платформе MiSeq («Illumina»), сборку генома *de novo* осуществляли при помощи программ Spades, MIRA 4.0, Newbler 2.6. Аннотацию генома проводили с помощью утилиты Prokka v. 1.11., геномных серверов RAST и BASys.

**Результаты.** Установлены основные характеристики генома *L. fermentum* 90 TC-4, подтверждено отсутствие в геноме детерминант антибиотикорезистентности, патогенности и вирулентности. Показано, что низкая сахаролитическая способность штамма связана с отсутствием соответствующих транспортных систем — специфичной для сахарозы фосфонолипидной системы *PTS\_ScrA* и специфичной для рибозы пермеазы *RbsD*, а также ряда ферментов. Проанализирован *CRISPR-Cas* locus штамма, выявлены уникальные спейсеры, перспективные для штаммовой индикации, изучены молекулярные механизмы антибиотикорезистентности штамма. С использованием схемы MLST, представленной в научной литературе, определены аллельные профили генов «домашнего хозяйства», установлено, что полученный для штамма *L. fermentum* 90 TC-4 аллельный профиль не соответствует ни одному из описанных ранее сиквенс-типов.

**Обсуждение.** Поскольку *L. fermentum* 90 TC-4 не несет детерминант антибиотикорезистентности, патогенности, вирулентности и интегрированных плазмид, штамм не представляет опасности в плане распространения указанных детерминант и может использоваться как пробиотический штамм-продуцент. Обнаруженные особенности *CRISPR*-локуса и аллельного профиля могут в дальнейшем использоваться для индикации штамма.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus fermentum*, полногеномное секвенирование, биоинформатический анализ, гены метаболизма сахаров, *CRISPR*-locus.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Точилина А.Г. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>

Белова И.В. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>

Соловьева И.В. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Иванова Т.П. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4076-0621>

Жирнов В.А. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1162-2417>

### АВТОР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ПЕРЕПИСКУ:

Точилина А.Г. — e-mail: lab-lb@yandex.ru

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Иванова Т.П., Жирнов В.А. Биоинформатический анализ генома производственного штамма *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2019;37(3):128-133. <https://doi.org/10.17116/molgen201937031128>

## Bioinformatic analysis of the genome *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 production strain

© A.G. TOCHILINA, I.V. BELOVA, I.V. SOLOVYEVA, T.P. IVANOVA, V.A. ZHIRNOV

Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Russia, 603000

At present, *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strain is widely used for production of probiotics, dietary supplements and food. This justifies the relevance of strain study using modern molecular-genetic methods.

Biochemical properties of the strain were examined using the API 50 CHL test system («BioMerieux», France), genome sequencing was performed on the MiSeq («Illumina») platform, *de novo* genome assembly was performed using Spades, MIRA 4.0 and Newbler 2.6 programs. Genome annotation was performed with the help of Prokka v. 1.11. utility and RAST and BASys genomic servers.

The main characteristics of *L. fermentum* 90 TC-4 genome have been established. It has been proved that the genome doesn't have any pathogenicity, virulence or antibiotic resistance determinants. It has been shown that the low saccharolytic capacity of the strain is associated with the absence of appropriate transport system — *PTS\_ScrA* and *RbsD* permease system specific for ribose as well as a number of enzymes. The *CRISPR-Cas* locus of the strain has been analyzed, unique spacers (which in future can be used for strain indication) have been revealed, molecular mechanisms of strain antibiotic resistance have been studied. Using the MLST scheme, presented in the scientific literature, allelic profiles of housekeeping genes have been established. It has been established that the allelic profile, obtained for *L. fermentum* 90 TC-4 strain, does not correspond to any of the previously

described sequence-types. D Since *L. fermentum* 90 TC-4 does not have determinants of antibiotic resistance, pathogenicity, virulence or integrated plasmids, the strain does not pose any hazard in terms of propagation of these determinants and can be used as a probiotic producer strain. The observed features of CRISPR locus and allelic profile can further be used to indicate the strain.

**Keywords:** *Lactobacillus fermentum*, probiotic strains, full genomic sequencing, bioinformatic analysis, sugar metabolism genes, CRISPR locus.

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Tochilina A.G. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>

Belova I.V. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>

Solovyeva I.V. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Ivanova T.P. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4076-0621>

Zhirnov V.A. — e-mail: lab-lb@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1162-2417>

#### CORRESPONDING AUTHOR:

Tochilina A.G. — e-mail: lab-lb@yandex.ru

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Tochilina A.G., Belova I.V., Solovyeva I.V., Ivanova T.P., Zhirnov V.A. Bioinformatic analysis of the genome *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 production strain. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2019;37(3):128-133. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen201937031128>

*Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 используется для производства фармацевтических препаратов, пробиотиков в форме биологически активных добавок (БАД) к пище и продуктов питания. Изначально этот штамм выделен на кафедре микробиологии Тартуского государственного университета (Эстония) от здорового человека. В результате изучения биологических свойств установлена его принадлежность к виду *L. fermentum* [1]. Штамм отличается технологичностью, проявляет выраженный антагонизм против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, но подробное изучение штамма и его свойств ранее проводили лишь с использованием фенотипических методов [1]. Позднее в комплексе методов, используемых для изучения и контроля производственных и перспективных для производства штаммов, введены методики, основанные на изучении отдельных генетических детерминант, что отвечает требованиям МУК 4.2.2602-10<sup>1</sup> и МУ 2.3.2.2789-10<sup>2</sup>. Согласно этим нормативным документам, для обеспечения безопасности и пригодности пробиотиков их штаммы-продуценты должны быть изучены с использованием современных молекулярно-генетических методов для подтверждения отсутствия трансмиссивных генов антибиотикорезистентности, генов вирулентности, островков патогенности и интегрированных плазмид. Но и такой подход в настоящее время уже не является достаточным для характеристики пробиотических штаммов. NGS секвенирование генома штамма позволяет провести углубленный анализ и не только установить наличие или отсутствие детерминант, перечисленных выше, и их геномный контекст, но и изучить другие участки генома, на-

пример CRISPR-локус, анализ которого позволит сделать вывод о взаимодействии клеток указанного штамма с фагами в прошлом и выявить детерминанты, перспективные для внутривидового типирования [2, 3]. У пробиотических штаммов рода *Lactobacillus* несомненный интерес также представляют детерминированные в геноме пути транспорта и метаболизма сахаров, поскольку их классическая микробиологическая идентификация основана именно на сахаролитических свойствах [4].

## Материал и методы

В работе использовали штамм *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 из Государственной коллекции лактобацилл ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, полученный от авторов штамма при совместной работе над лактобактерином [5].

**Культивирование штамма.** Для восстановления и рассева штаммов бактерий рода *Lactobacillus* после вскрытия ампулы лиофильную массу заливали 1 мл среды MPC-1 («Lactobacillus MRS broth, HiMedia», Индия), переносили в стерильную пробирку и инкубировали при 37 °С 24 ч (I генерация штамма). На 2-е сутки 0,5 мл культуры I генерации пересевали на MPC-1 и инкубировали при 37 °С 24 ч (II генерация штамма). Далее штамм II генерации рассекали из разведений (10<sup>-4</sup>—10<sup>-7</sup>) по 0,05 мл на плотную среду MPC-4 (*Lactobacillus* MRS agar, HiMedia, Индия) и инкубировали 48 ч при 37 °С в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов («Gas Pak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, Becton Dickinson», США).

**Идентификация штамма.** Выросшие колонии микроорганизмов идентифицировали с использованием времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex («Bruker Daltonics», Германия), для дальнейшей работы отбирали культуры, по результатам масс-спектрометрии имевшие значения Score 2,100 и более.

**Изучение биохимических свойств.** Биохимические свойства штамма подтверждали с использованием тест-системы API 50 CHL («BioMerieux», Франция).

<sup>1</sup>Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические указания №4.2.2602-10. М.: Роспотребнадзор; 2011.

<sup>2</sup>Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: методические указания №2.3.2.2789-10. М.: Роспотребнадзор; 2010.

**Полногеномное секвенирование.** Для проведения полногеномного секвенирования геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, Германия), фрагментацию производили с использованием системы ультразвуковой фрагментации Covaris E210 («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Очистку смеси и отбор фрагментов 200–700 п.н. проводили при помощи магнитных частиц Agencourt AM Purebeads («Beckman Coulter», США) и буфера NEB Next Sizing Buffer («New England Biolabs», США). Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора TrueSeq («Illumina Inc», США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq («Illumina»). Исходные риды были обработаны утилитой Trimmomatic со стандартными параметрами для Illumina. Затем обработанные риды использовали для сборки генома *de novo* при помощи программ Spades, MIRA 4.0, Newbler 2.6.

**Аннотация генома.** Аннотацию генома производили с помощью утилиты Prokka v. 1.11 [6], геномного сервера RAST [7] и BASys (<https://www.basys.ca>). Изучение CRISPR-кассеты, поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности проводили с использованием программных продуктов, представленных на сайте Центра геномной эпидемиологии ([www.cge.cbs.dk](http://www.cge.cbs.dk)): программ ResFinder 2.0, Pathogen Finder и Crispr Finder [8–10].

**Проведение MLST.** При MLST типировании для проведения анализа аллелей использована схема, предложенная T. Dan и соавт., основанная на анализе 11 генов «домашнего хозяйства» [11].

## Результаты и обсуждение

**Сборка генома.** Была произведена сборка генома *de novo*, в результате собрано 93 контига со средним покрытием 254.12. Общая длина всех контигов составила 1.822.484 н.о., N50 — 36919 п.н., GC состав — 51,9%. В процессе аннотации и анализа генома определены 1420 последовательностей, кодирующих белки, 54 последовательности тРНК, 11 — рРНК и 1 CRISPR-локус. Драфт генома депонирован в международной базе данных GenBank под номером LBDH00000000.

При сравнительном анализе драфта генома исследуемого штамма с последовательностями геномов вида *L. fermentum*, доступными в базе данных NCBI, установлено, что наиболее близким к исследуемому оказался штамм *L. fermentum* NCDC 400 (PDKX00000000.1) — идентичность составила 89%.

**Аннотирование.** При аннотации с использованием RAST установлено, что в геноме представлены 283 функциональные подсистемы. Наибольший процент генов — 14,5% (173 гена) в исследуемом драфте генома соответствует подсистеме «Аминокислоты и их производные», 11,1% (133 гена) приходится на детерминанты утилизации сахаров, 10,7% (128 генов) соответствует подсистеме «Белковый метаболизм», 9,3% (111 генов) — подсистеме «Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты».

С использованием приложения KEGG Metabolic analysis установлено, что *L. fermentum* 90 TC-4 обладает необходимым комплексом ферментов пентозофосфатного пути и ферментами, обеспечивающими транспорт и метаболизм гексоз и пентоз. Большинство ферментов пентозофосфатного пути сосредоточено в пределах 99 и 169 контигов.

**Исследование детерминант метаболизма сахаров.** Фенотипически данный штамм обладает способностью утили-

зировать лишь отдельные сахара — D-глюкозу, фруктозу, галактозу, лактозу, мальтозу, мелибиозу, раффинозу, гидролизовать эскулин и глюконат калия. *L. fermentum* 90 TC-4 не способен утилизировать рибозу, сахарозу, арабинозу и маннозу, хотя более 80% лактобацилл этого вида утилизируют эти сахара [4].

Детальный анализ сегмента генома, отвечающего за транспорт и утилизацию сахаров, позволил выявить некоторые структурные особенности: отсутствие соответствующей фосфоенолпируватной системы (PTS<sub>ScrA</sub>) для сахарозы; отсутствие высокоаффинной пермеазы RbsD для рибозы; отсутствие PTS<sub>Tre</sub> и других генов метаболизма трегалозы (трегалозо-6-фосфат гидролазы, трегалозо-6-фосфат фосфорилазы, регуляторного белка TreR) и полное отсутствие арабинозного оперона. Обнаружены гены транспортных систем для маннозы, глюкозы и фруктозы (PTS WU69\_06895; WU69\_07500; WU69\_05015), специфической пермеазы GPH-семейства (WU69\_07335) и β-галактозидазы (WU69\_08605), отвечающие за поступление в клетку и метаболизм галактозы, лактозы и галактоолигосахаридов. Также выявлены детерминанты, кодирующие мальтозофосфорилазу (WU69\_03215), ответственную за метаболизм мальтозы, и установлено отсутствие в геноме специфического ABC-транспортера MalEFG/MsmK для данного субстрата. Обнаружены детерминанты, кодирующие пермеазу WU69\_07335 и ферменты метаболизма мелибиозы и раффинозы: α-галактозидазы (WU69\_07340) и сахарозо-6-фосфат гидролазы (WU69\_07660).

**Доказательство безопасности штамма.** В ходе анализа генома с использованием программы Pathogen Finder отдельных детерминант и островков патогенности не было обнаружено. Поскольку ранее было установлено, что фенотипически штамм *L. fermentum* 90 TC-4 обладает резистентностью к ряду антибактериальных препаратов — аминогликозидам, хлорамфениколу, цефалоспорином, фторхинолонам [12], полученная последовательность генома проанализирована с целью поиска соответствующих детерминант антибиотикорезистентности.

При использовании программы ResFinder детерминант резистентности к перечисленным выше антибиотикам выявлено не было, однако с помощью RAST были обнаружены две детерминанты, отнесенные программой к группе «β-лактамазы и пенициллинсвязывающие белки», — WU69\_03125 и WU69\_02400. С использованием BLAST белок WU69\_03125 был идентифицирован как пенициллин связывающий белок (белок pbpX), а WU69\_02400 отнесен к группе сериновых гидролаз, т.е. потенциально он может являться β-лактамазой, которая обеспечивает устойчивость штамма к цефалоспорином. Но при использовании сервера для аннотации геномов BASys (<https://www.basys.ca>) белок WU69\_02400 был распознан как пенициллинсвязывающий белок и установлен его гомолог — penicillin binding protein pbp4B *E. coli* K-12 (G187082101). С использованием RAST был изучен геномный контекст и установлено, что данные детерминанты расположены вне транспозонов и интегров и не входят в состав встроенной плазмиды.

Затем был выполнен анализ нуклеотидных последовательностей в консервативной области генов GyrA и ParC, кодирующих А-субъединицу ДНК-гиразы (WU69\_03325) и А субъединицу топоизомеразы IV (WU69\_01385) соответственно. Был проведен поиск аминокислотных замен, которые обычно обуславливают устойчивость бактерий к фторхинолонам, так как приводят к изменению конфигурации данных белков, образующих так называемый хино-

лоновый карман [13, 14]. Значимые замены как для GyrA — Ser83Phe/Тур/Ala и Asp87 Gly/Asn/Тур, так и для ParC — Glu84Lys и Ser80Leu выявлены не были.

Других детерминант антибиотикорезистентности в геноме не обнаружено, но выявлены гены, кодирующие эффлюксные помпы, принадлежащие к семейству MATE (WU69\_06475, WU69\_04310) и MFS (WU69\_RS09275, WU69\_06990).

**Анализ CRISPR-локуса.** С целью поиска штаммоспецифичных особенностей был проанализирован CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) — локус штамма, содержащий высококонсервативные белки (Cas-белки) и короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами. CRISPR — механизм, защищающий клетку от «генетической агрессии» и предотвращающий проникновение в клетку бактериофагов и плазмид [15].

Установлено, что данный оперон находится в пределах 212 контига (NCBI:NZ\_LBDH01000009), в его структуру входят комплекс cas-белков и 22 повтора, длиной 28 нуклеотидов, которые разделяют 21 уникальный спейсер (см. рисунок).

При анализе организации оперона и представленности Cas-белков (наличие CAS3 белка) выявлено, что система CRISPR/Cas данного штамма относится к I типу [16]. При исследовании палиндромного повтора с использованием BLAST установлено, что его последовательность аналогична последовательности повтора CRISPR—Cas системы штамма *L. Fermentum* F-6. А при анализе последовательности спейсеров выявлено, что два из них гомологичны нуклеотидным последовательностям фагов лактобацилл — *Lactobacillus phage* LF1 (HQ141410) и *Lactobacillus phage* Lfe Inf (KP054477), принадлежность остальных спейсеров установить не удалось.

**MLST-анализ.** Проанализированы также отдельные гены «домашнего хозяйства» исследуемого штамма с целью мультилокусного сиквенстипирования (MLST) исследуемого штамма.

Фрагменты генов *L. fermentum* 90 TC-4 сравнивались с нуклеотидными последовательностями, представленными в научной литературе [10], при полном совпадении последовательности исследуемого изолята с референсной присваивался соответствующий номер аллели (см. таблицу).

Установлено, что последовательность *murC* содержит точечную замену Т/С в позиции 716 п.н., что не позволило отнести детерминанту ни к одной из 12 ранее описанных аллелей, поэтому новой аллели был присвоен порядковый номер 13. Полученный в результате анализа аллельный профиль не соответствует ни одному из описанных ранее сиквенс-типов.

Штамм *L. fermentum* 90 TC-4 относится к облигатно гетероферментативным лактобациллам группы С, у которых основным путем метаболизма углеводов является пентозофосфатный путь [4], что связано с отсутствием ключевого фермента гликолиза — фосфофруктокиназы и наличием

фосфофруктокиназы. Поступление различных субстратов в клетки исследуемого штамма регулируется как с помощью специфических (для глюкозы, фруктозы, галактозы, лактозы) фосфоенолпируватных систем или пермеаз, так и с помощью неспецифических пермеаз или H<sup>+</sup> симпорта в случае мелибиозы, раффинозы и мальтозы. Фенотипические особенности штамма — неспособность к утилизации рибозы, сахарозы, арабинозы и маннозы — могут быть объяснены отсутствием в геноме детерминант, кодирующих соответствующие транспортные системы и некоторые метаболические ферменты, или их экспрессии.

Так, исследуемый штамм содержит в геноме полный оперон утилизации D-маннозы, состоящий из 7 генов: регуляторного *manO*, маннозо-6-фосфат изомеразы *manA*, фосфоманномутазы *manB* и специфичной PTS (*manXb*, *manXa*, *manY*, *manZ*), который, однако, не проявляется фенотипически. Согласно классификации RAST, метаболический вариант представленного оперона — 1.11, что указывает на полный набор генов и возможность утилизации внеклеточной маннозы. Вероятно, гены маннозного оперона у исследуемого штамма не экспрессируются и не проявляют себя фенотипически в силу изменения среды обитания штамма и дефицита этого субстрата в организме человека.

Способность к утилизации рибозы и сахарозы характерна для 95 и 86% штаммов вида *L. fermentum* [4]. Гены утилизации этих сахаров в геноме *L. fermentum* 90 TC 4 представлены частично. В состав оперона утилизации рибозы входят гены рибокиназы *RbsK*, репрессора оперона *RbsR* и фермента рибозо-5-фосфат изомеразы, ген специфической пермеазы *RbsD* не представлен. Обращает на себя внимание тот факт, что, по данным RAST, в геномах штаммов, способных к утилизации рибозы (*L. brevis*, *L. plantarum*), присутствует полный оперон, включая *RbsD*. В геномах штаммов *L. delbrueckii* и *L. helveticus*, которые, по данным литературы [4], не способны утилизировать рибозу, оперон также представлен частично (гены рибокиназы *RbsK* и рибозо-5-фосфат изомеразы), ген пермеазы *RbsD* отсутствует.

Путь утилизации сахарозы также детерминирован частично, включает ген фруктокиназы *FruK* и регуляторные гены *ScrR* и *CscR*, гены транспортной системы PTS *ScrA* отсутствуют. Такое строение оперона, по данным RAST, характерно и для штаммов других видов, не способных утилизировать сахарозу — *L. delbrueckii* sp. *buigaricus* и *L. helveticus*, в то время как представители видов *L. acidophilus* и *L. plantarum*, обладающие способностью утилизировать сахарозу, имеют полный оперон, включая транспортную систему.

В геноме штамма полностью отсутствует оперон утилизации L-арабинозы. Согласно данным литературы, около 30% штаммов вида *L. fermentum* способны утилизировать этот моносахарид [4], в геномах отдельных штаммов данного вида этот оперон также отсутствует (*L. fermentum* ATCC 14931), у других штаммов (*L. fermentum* IFO 3956, *L. fermentum* CECT 5716) присутствует в полном объеме, как и у предста-

#### Аллельный профиль штамма *L. fermentum* 90 TC-4

<i>L. fermentum</i> 90 TC-4	<i>purG</i>	<i>groB</i>	<i>groE1</i>	<i>recA</i>	<i>clpX</i>	<i>pepX</i>	<i>uvrC</i>	<i>dnaK</i>	<i>murC</i>	<i>murE</i>	<i>dnaA</i>
Аллель	2	2	1	1	2	1	3	1	13 <sub>new</sub> 716 T/C	2	1
Номер в GenBank	MH 924 159	MH 924 162	KX 965 738	KX 965 741	MH 898 729	MH 898 730	MH 924 160	MH 898 731	MH 924 163	MH 937 727	MH 924 161



### Структурная организация CRISPR-локуса *L. fermentum* 90 TC-4.

Стрелками обозначены соответствующие Cas-белки, ромбами обозначены повторы, прямоугольниками — уникальные спейсеры.

вителей других видов лактобацилл, способных метаболизировать арабинозу, — *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. reuteri*.

Таким образом, неспособность к утилизации рибозы и сахарозы штаммом *L. fermentum* 90 TC 4 связана с потерей генов соответствующих транспортных систем — высокоаффинной пермеазы RbsD и фосфоенолпируватной системы PTS\_ScrA, а арабинозы — с полным отсутствием соответствующего оперона. Вероятно, эти особенности являются результатом эволюционной редукции генома микроорганизма, имеющего ограниченный ареал обитания — организм человека. Необходимо отметить, что низкая сахаролитическая активность штамма является его характерной особенностью и может быть использована в качестве «метки штамма».

Другой важный вопрос — анализ генома на наличие детерминант устойчивости к антибиотикам, патогенности и интегрированных плазмид. Известно, что к антибиотикам из группы пептидов (ванкомицин, тейкопланин) представители рода *Lactobacillus* обладают природной устойчивостью за счет прочности клеточной стенки и отсутствия цитохромзависимого электронного транспорта [17]. Благодаря ранее проведенным исследованиям *L. fermentum* 90 TC-4 имеет изученный профиль антибиотикорезистентности, обладает устойчивостью к следующим антибиотикам: гентамицину (MIC 50 мкг/мл), цефотаксиму (MIC 64 мкг/мл), цефепиму (MIC 16 мкг/мл), ципрофлоксацину (MIC 500 мкг/мл), фуразолидону (MIC 500 мкг/мл), эритромицину (MIC 2,5 мкг/мл), тетрациклину (MIC 25 мкг/мл), ванкомицину (MIC 256 мкг/мл) и сульфаниламидам (MIC 12800 мкг/мл) [12]. В результате анализа драфта генома *L. fermentum* 90 TC-4 обнаружены две детерминанты антибиотикорезистентности. Они распознаны как пенициллинсвязывающие белки, расположены вне транспозонов и интегров и не входят в состав встроенной плазмиды. При анализе генома также не выявлено точечных мутаций и в первичной мишени хинолонов — консервативной области QRDR-генов, т.е. устойчивость данного микроорганизма к фторхинолонам обусловлена, вероятно, наличием эффлюксных помп семейств MATE и MFS, которые могут обуславливать устойчивость штамма к различным антимикробным препаратам. Факт о важности механизмов эффлюкса в формировании антибиотикорезистентности представителей рода *Lactobacillus* находит подтверждение и в литературе [18]. В ходе анализа генома с использованием Plasmid Finder и Pathogen Finder детерминант патогенности, островков патогенности и интегрированных плазмид не было обнаружено, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к производственным и производственно-перспективным штаммам пробиотиков.

Определенный интерес представлял анализ обнаруженной в геноме исследуемого штамма CRISPR-кассеты. Поскольку последовательности CRISPR региона не коррели-

руют с филогенией и их строение может отличаться даже у разных штаммов одного вида, данная область генома очень перспективна в плане типирования микроорганизмов [19, 20]. Несмотря на то что области палиндромных повторов в CRISPR-регионе *L. fermentum* 90 TC-4 не являются уникальными и аналогичны последовательности повтора CRISPR—Cas системы штамма *L. fermentum* F-6, в данном участке генома присутствуют неидентифицированные спейсерные последовательности, которые могут являться перспективными для дальнейшего поиска «метки штамма».

В настоящее время для типирования штаммов наиболее широко используется метод мультилокусного сиквенстипирования (MLST), предполагающий установление аллельных профилей отдельных генов «домашнего хозяйства» исследуемого штамма. Комбинация аллельных профилей генов и формирует конкретный сиквенс-тип (ST), при установлении которого можно более полно характеризовать штамм, определить его принадлежность к какому-либо клону [21]. Ранее для этого использовали отдельные геномные детерминанты — 16SrRNA, pheS, а также ряд генов, присутствующих в схеме MLST, использованной в данном исследовании [22—24]. Централизованные общедоступные базы данных для *L. fermentum* пока отсутствуют, поэтому при проведении анализа аллельного профиля штамма были использованы данные научной литературы, полученные для микроорганизмов пищевого происхождения (кумыс и другие кисломолочные напитки) преимущественно из Монголии и Тибета, в то время как *L. fermentum* 90 TC-4 выделен на территории Эстонии от здорового человека. Это объясняет несоответствие аллельного профиля исследуемого штамма ни одному из описанных сиквенс-типов и подтверждает необходимость создания базы данных нуклеотидных последовательностей изолятов лактобацилл, использующихся в российской пищевой и фармацевтической промышленности.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлены основные характеристики генома *L. fermentum* 90 TC-4, подтверждено отсутствие в геноме детерминант антибиотикорезистентности, патогенности и вирулентности. Показано, что низкая сахаролитическая способность штамма связана с отсутствием оперона утилизации L-арабинозы и отдельных транспортных систем — специфичной для сахарозы *PTS\_ScrA* и специфичной для рибозы пермеазы *RbsD*. Проанализирован *CRISPR-Cas* locus штамма, выявлены уникальные спейсеры, перспективные для штаммовой индикации, определены генетические основы антибиотикорезистентности штамма. Подтверждено, что штамм удовлетворяет современным требованиям к производственным штаммам и может использоваться в качестве продуцента пробиотиков.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Ленцнер А.А. *Некоторые результаты изучения лактобацилл микрофлоры человека*. Материалы V конференции Таллинского научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Таллин. 1964. Lenzner AA. *Some results of the study of human microflora lactobacilli*. Proceedings of the V conference of Tallinn Institute of epidemiology, Microbiology and hygiene. Tallin. 1964. (In Russ.).
- Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013;2:3-12. Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija*. 2013;2:3-12. (In Russ.).
- Horvath Ph, Coûté-Monvoisina AC, Romerob DA, Boyavala P, Fremaux Ch, Barrangoub R. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol*. 2009;131:62-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.030>
- Hammes WP, Hertel C. The genus of *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*. 2006;4:320.
- Тарасова Н.Б. *Сравнительное изучение лактобактерий и E. coli M-17 в целях разработки нового препарата — Лактобактерина*: Дис. ... д-ра мед. наук. Горький. 1969. Tarasova NB. *Comparative study of lactobacilli and E. coli M-17 in order to develop a new drug — Lactobacterin*: Dis. ... d-ra med. nauk. Gorky. 1969. (In Russ.).
- Seemann T, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30:2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*. 2008;8:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Cosentino S, Voldby LM, Møller AF, Lund O. PathogenFinder — Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. *PLoS ONE*. 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel K. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(1):172.
- Dan T, Liu W, Yuqin Song Y, Xu H, Menghe B, Zhang H, Sun Z. The evolution and population structure of *Lactobacillus fermentum* from different naturally fermented products as determined by multilocus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*. 2015;15:107. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0447-z>
- Соловьева И.В., Тоцилина А.Г., Белова И.В., Ефимов Е.И., Новикова Н.А., Иванова Т.П. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика. *Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского*. 2012;2: 85-92. Solovyeva IV, Tochilina AG, Belova IV, Efimov EI, Novikova NA, Ivanova TP. Construction of an immobilized form of the liquid probiotic. *Vestnik Nizhegorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2012;2:85-92. (In Russ.).
- Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии*. 2004;44:263-306. Sidorenko SV, Tishkov VI. Molecular bases of antibiotic resistance. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2004;44:263-306. (In Russ.).
- Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Charles M, Franz AP. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Appl and Environ Microbiol*. 2007;73:730. <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>
- Шашкова А.В., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Структура и функциональная роль CRISPR-системы бактерий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011;2:49-52. Shashkova AV, Goryaev AA, Smirnova NI. Structure and Functional Role of Bacterial CRISPR System. *Problemy osobo opasnyh infekcij*. 2011;2:49-52. (In Russ.).
- Makarova KS, Wolf H, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- Викторов Д.В., Пивень Н.Н. Активный мембранный транспорт и множественная антибиотикорезистентность бактерий. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2001;3:3-8. Viktorov DV, Piven NN. Active membrane transport and bacterial multiple antibiotic resistance. *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija*. 2001;3:3-8. (In Russ.).
- Devirgiliis C, Zinno P, Perozzi G. Update on antibiotic resistance in food-borne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front Microbiol*. 2013;4:301. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00301>
- Stefanovic E, Fitzgerald G, McAuliffe O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol*. 2017;61:33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- Barrangou R, Dudley EG. CRISPR-Based Typing and Next-Generation Tracking. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2016;7:395-411. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015729>
- Антонов В.А., Алтухова В.В., Савченко С.С., Замараев В.С., Илюхин В.И., Алексеев В.В. Использование мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и амплификации произвольными праймерами (RAPD) для дифференциации штаммов возбудителя сапа. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2007;3:3-8. Antonov VA, Altuhova VV, Savchenko SS, Zamaraev VS, Ilyuhin VI, Alekseev VV. The Use of Multilocus Sequence Typing (MLST) and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for the Differentiation between Strains of *Burkholderia mallei*. *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija*. 2007;3:3-8. (In Russ.).
- Кузнецова Т.В., Кебекбаева К.М., Джакибаева Г.Т., Молжигитова А.Е. Генотипирование штамма молочнокислых бактерий методом ПЦР-анализа. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;5. Дата обращения: 13.11.17. Kuznecova TV, Kebekbaeva KM, Dzhakibaeva GT, Molzhigitova AE. Lactic acid bacteria strain PCR genotyping. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya*. 2016;5. Available at: 13.11.17. (In Russ.). <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25349>
- Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий и их таксономическая идентификация. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;2. Дата обращения: 13.11.17. Shurhno RA, Vologin SG, Gibadullina FS, Tagirov MSh. Screening of natural strains of lactic acid bacteria and their taxonomic identification. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya*. 2015;2. Available at: 13.11.17. (In Russ.). <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21189>
- Шевцов А.Б., Кушугулова А.Р., Тыныбаева И.К., Кожамметов С.С., Абжалелов А.Б., Момыналиев К.Т., Стоянова Л.Г. Идентификация фенотипически и генетически близких видов *Lactobacillus* на основе анализа нуклеотидной последовательности генов 16S rRNA, groEL, groV и groB. *Микробиология*. 2011;80:659-668. Shevtsov AB, Kushugulova AR, Tynybaeva IK, Kozhakhmetov SS, Abzhalelov AB, Momynaliev KT, Stoyanova LG. Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the groEL, groV, groB, and 16S rRNA genes. *Mikrobiologija*. 2011;80:659-668. (In Russ.).

Поступила в редакцию 01.12.17  
 Received 01.12.17  
 После доработки 18.10.18  
 Revised 18.10.18  
 Принята к публикации 23.04.19  
 Accepted 23.04.19