

# ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БИФИДОБАКТЕРИЙ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИЕ ИХ ШТАММОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

DOI: 10.17691/stm2022.14.5.04

УДК 615.281.5:575:616.921.5

Поступила 12.05.2022 г.



**А.Г. Точилина**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции<sup>1</sup>; доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины<sup>2</sup>;

**И.В. Белова**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции<sup>1</sup>; доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины<sup>2</sup>;

**Т.Н. Ильичева**, д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа<sup>3</sup>;

**В.Ю. Марченко**, к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа<sup>3</sup>;

**В.А. Жирнов**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции<sup>1</sup>;

**С.Б. Молодцова**, научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции<sup>1</sup>;

**А.В. Иконников**, лаборант-исследователь<sup>2</sup>;

**И.В. Мухина**, д.б.н., профессор, директор Института фундаментальной медицины, зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>2</sup>;

**А.С. Благодрава**, д.м.н., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики; профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины; проректор по научной работе<sup>2</sup>;

**И.В. Соловьева**, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией микробиома человека и средств его коррекции<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. М. Ямская, 71, Н. Новгород, 603950;

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

<sup>3</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, 630559

**Цель исследования** — анализ особенностей генома пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* 379, *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Bifidobacterium bifidum* 791 и изучение их противовирусной активности.

**Материалы и методы.** Проведено полногеномное секвенирование трех штаммов бифидобактерий с использованием платформы MiSeq (Illumina Inc., США). Аннотацию геномов выполняли с помощью утилиты Prokka v. 1.11 и геномного сервера RAST. Поиск отдельных генетических детерминант проводили с использованием программ ResFinder 3.2, PathogenFinder, PlasmidFinder, RAST и Bagel 4. Исследование антивирусной активности штаммов против вирусов гриппа А осуществляли с использованием клеток MDCK (клетки почки собаки Мадина–Дарби), эпидемического штамма вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) (EPI\_ISL\_332798), штамма высокопатогенного вируса гриппа птиц A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) (EPI\_ISL\_336925) и витального красителя нейтрального красного.

**Результаты.** В геномах всех изученных штаммов обнаружены детерминанты, ответственные за утилизацию углеводов растительного происхождения, в геномах *B. longum* 379 и *B. bifidum* 791 представлены гены ключевых ферментов синтеза триптофана и фолиевой кислоты. Особенностью генома *B. bifidum* 791 является наличие детерминант, ответственных за синтез термостабильных бактериоцинов I типа — флавуцина и лассо-пептида. Установлено, что выраженную антивирусную активность против обоих штаммов гриппа А показал штамм *B. bifidum* 791, супернатант которого подавлял размножение вирусов *in vitro* до разведения 1:8, а клетки ингибировали репродукцию вирусов до концентрации  $6 \cdot 10^6$  КОЕ/мл.

**Заключение.** Анализ полных геномов *B. longum* 379, *B. bifidum* 1 и *B. bifidum* 791 показал особенности, обуславливающие их штаммоспецифические свойства, выводы о которых ранее делались эмпирически, на основе косвенных признаков. В геномах штаммов *B. longum* 379 и *B. bifidum* 791 в отличие от штамма *B. bifidum* 1 обнаружены ключевые ферменты синтеза триптофана и фолиевой кислоты. Эти вещества разнонаправленно влияют на организм человека, в том числе оказывают тимолептическое действие (снижение эмоционального напряжения, раздражительности, тревоги, устранение вялости, апатии, тоски, беспокойства) и регулируют когнитивную активность. Наличие в геноме штамма *B. bifidum* 791 детерминант, ответственных за синтез термостабильных бактериоцинов I типа, обуславливает его выраженную противовирусную активность.

**Ключевые слова:** *Bifidobacterium*; пробиотики; противовирусная активность; полногеномное секвенирование; вирус гриппа А.

Для контактов: Точилина Анна Георгиевна, e-mail: lab-lb@yandex.ru

**Как цитировать:** Tochilina A.G., Belova I.V., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Yu., Zhirnov V.A., Molodtsova S.B., Ikonnikov A.V., Muhkina I.V., Blagonravova A.S., Soloveva I.V. Genome features of probiotic bifidobacteria determining their strain-specific properties. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(5): 36, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.5.04>

English

## Genome Features of Probiotic Bifidobacteria Determining Their Strain-Specific Properties

**A.G. Tochilina**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means of Its Correction<sup>1</sup>; Associate Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine<sup>2</sup>;  
**I.V. Belova**, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means for Its Correction<sup>1</sup>; Associate Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine<sup>2</sup>;  
**T.N. Ilyicheva**, DSc, Leading Researcher, Department of Zoonotic Infections and Influenza<sup>3</sup>;  
**V.Yu. Marchenko**, PhD, Leading Researcher, Department of Zoonotic Infections and Influenza<sup>3</sup>;  
**V.A. Zhirnov**, PhD, Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means of Its Correction<sup>1</sup>;  
**S.B. Molodtsova**, Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means of Its Correction<sup>1</sup>;  
**A.V. Ikonnikov**, Research Assistant<sup>2</sup>;  
**I.V. Muhkina**, DSc, Professor, Director of the Institute of Fundamental Medicine; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>2</sup>;  
**A.S. Blagonravova**, MD, DSc, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics; Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine; Vice-Rector for Science<sup>2</sup>;  
**I.V. Soloveva**, DSc, Associate Professor, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Human Microbiome and Means of its Correction<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>2</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>3</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

**The aim of the study** was to analyze the genome features of the probiotic strains *Bifidobacterium longum* 379, *Bifidobacterium bifidum* 1, and *Bifidobacterium bifidum* 791 and study their antiviral activity.

**Materials and Methods.** Whole genome sequencing of three strains of bifidobacteria was performed on the MiSeq platform (Illumina Inc., USA). The genomes were annotated using the Prokka v. 1.11 utility and RAST genomic server. The individual genetic determinants were searched using the ResFinder 3.2, PathogenFinder, PlasmidFinder, RAST, and Bagel 4 software. The antiviral activity of the strains against influenza A viruses was studied using MDCK cells (Madin–Darby canine kidney cells), the epidemic strain of influenza A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) (EPI\_ISL\_332798), the highly pathogenic avian influenza virus A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) strain (EPI\_ISL\_336925), and neutral red vital dye.

**Results.** The genomes of all studied strains contained determinants responsible for utilization of carbohydrates of plant origin; the genes of key enzymes for the synthesis of tryptophan and folic acid are present in the genomes of *B. longum* 379 and *B. bifidum* 791. A feature of the *B. bifidum* 791 genome is the presence of determinants responsible for the synthesis of thermostable type I bacteriocins — flavucin and lasso peptide. The *B. bifidum* 791 strain was found to show pronounced antiviral activity against both the strains of influenza A, the supernatant of which suppressed viral replication *in vitro* up to a dilution of 1:8, and the cells inhibited viral reproduction up to a concentration of  $6 \cdot 10^6$  CFU/ml.

**Conclusion.** The analysis of complete genomes of *B. longum* 379, *B. bifidum* 1, and *B. bifidum* 791 showed features that determine their strain-specific properties, the findings on which were previously made empirically based on indirect signs. In the genomes of *B. longum* 379 and *B. bifidum* 791 strains, in contrast to *B. bifidum* 1 strain, key enzymes for the synthesis of tryptophan and folic acid were found. These substances have an impact on the human body in many ways, including having a thymoleptic effect (reducing emotional stress, irritability, anxiety, eliminating lethargy, apathy, melancholy, anxiety) and regulating cognitive activity. The presence of determinants responsible for the synthesis of thermostable type I bacteriocins in the genome of *B. bifidum* 791 strain determines its pronounced antiviral activity.

**Key words:** *Bifidobacterium*; probiotics; antiviral activity; whole genome sequencing; influenza A virus.

### Введение

Бактерии рода *Bifidobacterium* обладают рядом уникальных свойств и приносят неоценимую пользу здо-

ровью человека, поэтому их традиционно используют в качестве штаммов-продуцентов пробиотиков [1].

К одним из важнейших свойств бифидобактерий-пробиотиков относят их метаболический потенциал.

В соответствии с концепцией академика А.М. Уголева, существуют два пищевых потока, поступающих из кишечника в другие органы и ткани: первый — результат всасывания продуктов ферментативного гидролиза пищи, а второй, не менее значимый, — всасывания продуктов бактериального гидролиза (симбионтное пищеварение) [2]. В результате гидролиза пробиотическими штаммами пищевых волокон, крахмала, олигосахаридов и т.д. синтезируются короткоцепочечные жирные кислоты — ценные метаболиты, оказывающие комплексный положительный эффект на здоровье человека: энергообеспечение эпителия, регуляцию моторики кишечника, усиление местного иммунитета и др. [2, 3].

Другим существенным свойством штаммов-пробиотиков является способность к синтезу нейромедиаторов и их предшественников. Например, известно, что нормальная микробиота способна влиять на концентрацию важнейшего нейротрансмиттера серотонина как опосредованно, за счет купирования местных и системных воспалительных процессов, так и прямым путем, выделяя его предшественник — триптофан. Недостаток серотонина вызывает нарушения мозговой деятельности и психические изменения — повышенную тревожность, депрессию и когнитивные расстройства [3, 4].

В настоящее время многие исследователи рассматривают бифидобактерии как терапевтическое средство для лечения и профилактики острых вирусных инфекций, описаны механизмы их противовирусного действия, причем показано, что активность бактерий против вирусов является штаммовой характеристикой [5–9].

Ранее выводы о роли и функциях в организме человека, биохимических и пробиотических свойствах бифидобактерий делались эмпирически, на основе косвенных признаков. В настоящее время использование полногеномного секвенирования с применением современных сервисов и методов биоинформационной обработки позволяет легко доказать наличие интересующих исследователя генетических детерминант, раскрыть и описать уникальные свойства штамма и в полной мере выявить его метаболический и пробиотический потенциал. Необходимо отметить, что получение подробной информации о свойствах конкретных пробиотических штаммов очень актуально в свете реализации концепции персонализированной медицины, т.е. делает возможным подбор индивидуального пробиотика с учетом особенностей здоровья и диагноза пациента.

**Цель данной работы** — анализ особенностей генома пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* 379, *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Bifidobacterium bifidum* 791 и изучение их противовирусной активности.

## Материалы и методы

Объектами исследования послужили штаммы *B. bifidum* 1 (Государственная коллекция патоген-

ных микроорганизмов, ГКПМ-Оболensk; №900791), *B. bifidum* 791 (ГосНИИГенетика, Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ВКПМ; №В-3300), *B. longum* 379 (ВКПМ; №В-2000), используемые для производства пробиотических лекарственных средств и продуктов питания.

Лиофильно высушенные штаммы восстанавливали и готовили вторую генерацию культуры с использованием гидролизатно-молочной среды (Syntex, Россия), агаризованной среды Bifidobacterium Agar (HiMedia, Индия) и газогенерирующих пакетов GasPak EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator (BD, США).

Видовую идентификацию проводили с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex speed LRF (Bruker Daltonics, Германия), пробоподготовку выполняли согласно стандартному операционному протоколу «Экстракция муравьиной кислотой» [10]. Все измерения делали в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Идентификацию, запись, обработку и анализ масс-спектров осуществляли с помощью программы BioTyper Rtc [11]. Биохимические свойства штаммов подтверждали с использованием тест-системы API 20 A (BioMerieux, Франция).

Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), фрагментацию проводили с применением системы ультразвуковой фрагментации Covaris E210 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Очистку смеси и отбор фрагментов (200–700 п.н.) выполняли при помощи магнитных частиц Agencourt AMPure beads (Beckman Coulter, США) и буфера NEBNext Sizing Buffer (New England Biolabs, США). Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора TrueSeq (Illumina Inc., США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina Inc.). Исходные нуклеотидные прочтения (риды) обработаны с помощью утилиты Trimmomatic со стандартными параметрами для Illumina. Обработанные риды использовали для сборки генома *de novo* при помощи программ Spades; MIRA 4.0; Newbler 2.6.

Аннотацию геномов проводили с помощью утилиты Prokka v. 1.11 [12] и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>). Поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности осуществляли с использованием программных продуктов, представленных на сайте Центра геномной эпидемиологии ([www.cge.cbs.dk](http://www.cge.cbs.dk)): программ ResFinder 3.2, PathogenFinder и PlasmidFinder [13–15]. Для обнаружения генетических детерминант, ответственных за продукцию бактериоцинов, применяли программу Bagel 4 [16]. Поиск ключевых ферментов, ответственных за синтез нейрометаболитов, проводили с использованием геномного сервера RAST и данных научной литературы [17–20].

Для исследования противовирусной активности штаммов против вирусов гриппа А использовали клеточные суспензии третьей генерации каждой культуры бифи-

добактерий, содержащие  $10^8$  КОЕ/мл, выращенные на гидролизатно-молочной среде. Суспензии в объеме 1 мл центрифугировали 10 мин при 3000 g, для исследования противовирусной активности штаммов брали бактериальные клетки и надосадочную жидкость. Токсичность клеточных суспензий, надосадочных жидкостей и питательной среды для клеток MDCK (клетки почки собаки Мадина–Дарби) была исследована с помощью МТТ-анализа [9].

Для анализа противовирусной активности штаммов *in vitro* использовали клетки MDCK, питательную среду DMEM Gibco (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 5% сыворотки плодов коровы (Gibco) и антибиотиков, а также штаммы вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) (EPI\_ISL\_332798) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) (EPI\_ISL\_336925), полученные из Коллекции микроорганизмов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Для исследования применяли витальный краситель нейтрального красного [21].

Терапевтический индекс рассчитывали делением 50% токсической дозы на 50% эффективную дозу. Для определения статистической значимости различий значений терапевтического индекса у разных субстанций использовали критерий  $\chi^2$ . Расчет проводили с помощью статистического программного пакета Statistica 6.0. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы изучали фенотипические признаки штаммов путем исследования их биохимических свойств и белковых масс-спектров с целью выбора культур, предназначенных для дальнейшего секвенирования.

После проведенного полногеномного секвенирования штаммов полученные риды использовали для сборки геномов *de novo* с применением современных биоинформационных программ. Геномы, собранные в формате контигов, зарегистрировали в международной базе данных GenBank. Основные характеристики геномов изученных штаммов представлены в таблице.

**Анализ генома штамма *B. longum* 379.** По данным, полученным с помощью сервиса PathogenFinder,

геном этого штамма не содержит детерминант патогенности, а с использованием программ PlasmidFinder и ResFinder 3.2 установлено, что геном не содержит интегрированных плазмид и детерминант антибиотикорезистентности. Данные об отсутствии детерминант устойчивости к антибиотикам подтверждены с использованием геномного сервера RAST, однако были выявлены другие механизмы резистентности — молекулярные эффлюксные насосы (помпы) семейства MATE (GenBank: KYJ82530.1) и цитоплазматический белок, защищающий рибосому от воздействия тетрациклина, — tetW (GenBank: KYJ81078.1).

При анализе метаболического потенциала штамма установлено, что наиболее широко представленными являются подсистемы белкового метаболизма и метаболизма сахаров, состоящие из 212 и 199 детерминант соответственно (рис. 1, а).

Подсистема метаболизма сахаров представлена детерминантами фосфокетолазного пути (fructose-6-phosphate phosphoketolase pathway), продуктами которого являются молочная, уксусная кислоты и этанол, а также детерминантами, ответственными за утилизацию моносахаров (ксилозы, рибозы, арабинозы), дисахаридов (сахарозы, мальтозы, лактозы, раффинозы и фосфоолигосахаридов), аминокислот и крахмала. Гены метаболизма аминокислот *NagA*, *NagB*, *NagK*, *NagR* и *NagT* расположены в пределах 8-го контига (NCBI: LKUQ01000023.1), а локус, ответственный за метаболизм крахмала, представлен генами, кодирующими ферменты GAT (KYJ81114.1), GS (KYJ81082.1), GBr (KYJ82453.1), GP (KYJ83271.1), GdBr (фермент деградации крахмала; KYJ82081.1), AMse (амиломальтаза; KYJ82084.1) и MalE (белок транспорта мальтозы и мальтодекстрина; KYJ78457.1).

Оперон утилизации раффинозы и фруктоолигосахаридов представлен детерминантами, кодирующими белки MsmR (регуляторный белок; KYJ82093.1), MsmE, MsmF, MsmG (транспортные белки; KYJ82142.1, KYJ82092.1, KYJ82141.1), SacA (KYJ78008.1), GtfA (сахарозо-фосфорилаза), Aga (KYJ83465.1), BG (бета-глюкозидаза).

В геноме штамма обнаружены детерминанты синтеза экзополисахаридов: гены синтеза рамнозы, расположенные в пределах 5-го контига (NCBI: LKUQ01000020.1), капсульных полисахаридов Wzb (тирозин-киназа; KYJ83195.1), Wzc (тирозин-фосфатаза; KYJ83223.1), детерминанты, ответственные за

Основные характеристики геномов изученных штаммов рода *Bifidobacterium*

Штамм	Количество контигов	Среднее покрытие	Размер генома, п.н.	GC-состав, %	Количество CDS*	Номер в базе GenBank
<i>B. longum</i> 379	24	150,0	2 387 620	60,2	1903	LKUQ00000000
<i>B. bifidum</i> 1	13	385,0	2 198 027	62,7	1521	NDX100000000
<i>B. bifidum</i> 791	33	150,0	2 285 457	62,4	1769	LKUR00000000

\* последовательности, кодирующие белки.



формирование сортаза-зависимых пилей — детерминанты SrtA (сортаза А; KYJ83477.1) и AP (KYJ83476.1), а также липопротеинов — Lgt (KYJ83617.1) и LspA (KYJ77995.1). Обнаружены также ключевые ферменты синтеза триптофана — триптофан-синтаза, субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  (KYJ83618.1, KYJ83619.1) — и фолиевой кислоты — дигидроптероат-синтаза (KYJ81979.1).

**Анализ генома штамма *B. bifidum* 1.** По данным, полученным с использованием сервиса PathogenFinder, геном данного штамма не содержит отдельных детерминант и островков патогенности, а с применением сервисов ResFinder 3.2 и PlasmidFinder установлено, что геном не содержит интегрированных плазмид и детерминант антибиотикорезистентности.

В ходе дальнейшего анализа с помощью геномного сервера RAST данные об отсутствии детерминант антибиотикорезистентности были подтверждены, а в геноме обнаружены молекулярные эффлюксные помпы семейства MATE (PDH98462.1). Фенотипически наличие этого молекулярного механизма может выражаться в устойчивости к ряду антибактериальных препаратов.

Выявлено, что у штамма наиболее широко представлены подсистемы метаболизма белков (225 детерминант) и сахаров (175 детерминант) (рис. 1, б). Подсистема метаболизма сахаров включает детерминанты фосфокетолазного пути, продуктами которых являются молочная, уксусная кислоты и этанол. Штамм обладает низкой способностью к метаболизму моносахаров, однако активен в отношении ди-, олигосахаридов и аминокислот — хитина и N-ацетилглюкозамина. Оперон утилизации аминокислот представлен генами, детерминирующими следующие ферменты: NagK (бета-галактозид-N-ацетилгексозамин; GenBank: PDH98478.1), NagA (PDH97531.1), NagB (PDH98129.1), транспортную систему ПТС NagT (PDH97280.1), регуляторный белок NagR, а также ферменты CbsA (бета-гексоминидаза; PDH98222.1) и Aga (PDH97428.1). В геноме также представлены гены, детерминирующие ферменты метаболизма крахмала: GAT, GS (PDH98335.1), GBr, GP (PDH97657.1), GdBr (PDH97486.1), AMse (амиломальтаза).

Генов синтеза экзополисахаридов не обнаружено, однако присутствуют детерминанты, ответственные за формирование сортаза-зависимых пилей — SrtA (PDH97100.1, PDH97310.1), а также липопротеинов клеточной стенки — Lgt (PDH98440.1) и LspA (PDH98074.1).

**Анализ генома штамма *B. bifidum* 791.** По данным, полу-

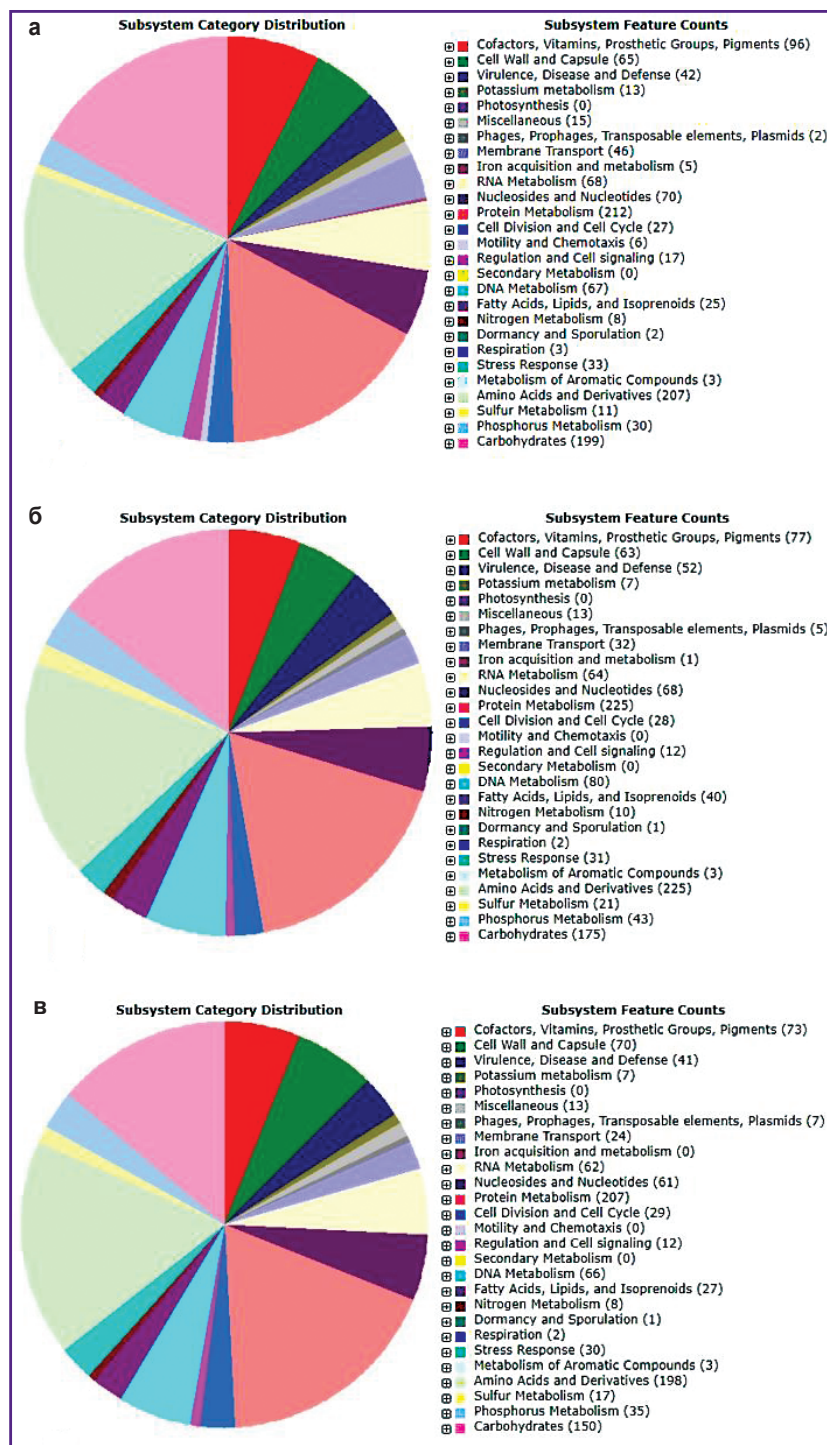


Рис. 1. Функциональная аннотация штаммов с использованием геномного сервера RAST:

а — *B. longum* 379; б — *B. bifidum* 1; в — *B. bifidum* 791

ченным с использованием сервиса PathogenFinder, установлено, что в геноме штамма отсутствуют детерминанты патогенности, а с помощью программ PlasmidFinder и ResFinder 3.2 выявлено, что геном не содержит интегрированных плазмид и детерминант антибиотикорезистентности. В ходе подробного анализа генома с помощью геномного сервера RAST были подтверждены данные об отсутствии детерминант антибиотикорезистентности, обнаружены другие механизмы, приводящие к фенотипически выраженной резистентности к ряду антибиотиков, — молекулярные эффлюксные помпы семейства MATE (KYJ84349.1, KYJ84414.1).

Установлено также, что широко представленными являются подсистемы белкового метаболизма и метаболизма сахаров, состоящие из 207 и 150 генетических детерминант соответственно (рис. 1, в). Подсистема метаболизма сахаров включает детерминанты фосфокетолазного пути, продуктами которых являются молочная, уксусная кислоты и этанол. По своим сахаролитическим и иным свойствам штамм *B. bifidum* 791 близок к штамму *B. bifidum* 1. Так, в геноме штамма *B. bifidum* 791 практически не представлены детерминанты метаболизма моносахаров, однако есть гены, ответственные за расщепление более сложных углеводов: ди-, олигосахаридов, аминсахаров и крахмала.

Локус, ответственный за утилизацию аминсахаров штамма *B. bifidum* 791, представлен генами, детерминирующими ферменты NagK (KYJ84330.1), NagA (KYJ85076.1), NagB (KYJ85077.1), транспортные системы ПТС NagT (KYJ85215.1, KYJ85216.1), регуляторный белок NagR (KYJ85078.1), а также CbsA (KYJ83728.1) и Aga (KYJ84485.1).

В геноме обнаружены детерминанты, кодирующие ферменты метаболизма крахмала, — GAT (KYJ83153.1), GS (KYJ84446.1), GBr (KYJ84933.1), GP (KYJ84691.1), GdBr (KYJ85154.1), AMse (KYJ84544.1) — и синтеза экзополисахаридов, включающие в том числе гены синтеза рамнозы, расположенные в пределах 3-го контига (NCBI: LKUR01000023.1), а также детерминанты, ответственные за формирование сортаза-зависимых пилей — SrtA (KYJ84870.1) и AP (KYJ84871.1) и липопротеинов клеточной стенки — Lgt (KYJ84380.1) и LspA (KYJ85145.1). Кроме того, обнаружены ключевые ферменты синтеза триптофана — триптофан-синтаза, субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  (KYJ84379.1, KYJ84378.1) и фолиевой кислоты — дигидроптероат-синтаза (KYJ84132.1).

В пределах 28-го контига (NCBI: LKUR01000021.1) обнаружены детерминанты, ответственные за синтез лассо-пептида, — рибосомно-продуцируемого пептида, проявляющего высокую противомикробную и противовирусную активность, и синтез бактериоцина флавуцина.

В результате проведенного анализа подтверждено, что штаммы *B. longum* 379, *B. bifidum* 1 и *B. bifidum* 791 не патогенны для человека, не содержат в геноме

генов антибиотикорезистентности трансмиссивного типа и интегрированных плазмид. Устойчивость к антибиотикам различных классов объясняется наличием молекулярных эффлюксных помп семейства MATE и протективного рибосомального белка TetW.

Установлено, что все штаммы способны утилизировать ди- и олигосахариды, аминсахара и крахмал. Продуктами их основного метаболизма являются молочная и уксусная кислоты. *B. longum* 379 и *B. bifidum* 791 содержат в геноме детерминанты синтеза экзополисахаридов, которые отсутствуют у *B. bifidum* 1. В геномах всех штаммов обнаружены детерминанты, ответственные за формирование сортаза-зависимых пилей и липопротеинов клеточной стенки.

Способность всех изученных штаммов утилизировать углеводы растительного происхождения: аминсахара (широко распространены в природе, входят в состав полисахаридов клеточных оболочек), фруктоолигосахариды (растительные сахара), раффинузу (часто встречается в семенах, корнеплодах, овощах), крахмал — обеспечивает конкурентное преимущество для их существования в составе микробиоты кишечника и реализацию пробиотических свойств (обеспечение колонизационной резистентности, антагонизм против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов). С другой стороны, комплекс активных бактериальных гидролаз обеспечивает наиболее эффективное усвоение пищи макроорганизмом и активное симбиотное пищеварение.

Ценными продуктами активного расщепления углеводов изученными штаммами бифидобактерий являются молочная (лактат) и уксусная (ацетат) кислоты, относящиеся к важнейшим анионам, обеспечивающим легкое закисление полости кишечника, способствующим лучшему всасыванию электролитов и подавляющим рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Высокий уровень лактата способствует протрузии макрофагов (проникновению их отростков из слизистой оболочки в полость кишечника) и определяет иммунорегуляторные свойства бифидобактерий. Ацетат — ценная короткоцепочечная жирная кислота — выполняет важные энергетические задачи, всасываясь в кровь и попадая в клетки различных органов и тканей, снижает уровень токсических метаболитов и канцерогенов, нормализует моторику желудочно-кишечного тракта, уменьшает образование кетонов [2, 22].

В геномах штаммов *B. bifidum* 791 и *B. longum* 379 обнаружены ключевые ферменты синтеза нейрометаболитов — триптофана и фолиевой кислоты. Продуктируемые бактериями триптофан и образующий в результате его декарбоксилирования триптамин могут доставляться с кровотоком в мозг и выполнять в нем роль предшественников моноаминовых нейротрансмиттеров [4]. Кроме того, более 90% общего пула важнейшего нейромедиатора серотонина в организме человека синтезируется в пищеварительном тракте в результате метаболизации триптофана,

поступающего с пищей и продуцируемого микробиотой [3]. Недостаток серотонина вызывает выраженные нарушения мозговой деятельности — снижение когнитивных функций, повышенную тревожность и депрессию. Ранее исследователями были получены доказательства способности бифидобактерий повышать уровень триптофана в крови лабораторных животных, облегчать их состояние в условиях стресса, т.е. оказывать выраженное тимолептическое действие [3].

Фолиевая кислота (витамин B<sub>9</sub>) — водорастворимый витамин, необходимый для роста и развития кровеносной и иммунной систем, ее недостаток может вызывать мегалобластную анемию (макроцитоз), повышает риск развития злокачественных опухолей, а при беременности служит причиной возникновения дефектов нервной трубки плода. Дефицит фолиевой кислоты также типичен для людей, страдающих депрессией [4]. Основные ее источники — пища (овощи, зелень, цитрусовые и др.) и микробиота кишечника человека, т.е. способность изученных штаммов к ее синтезу можно расценивать как важный дополнительный механизм введения этого вещества в организм человека.

Согласно современным научным данным, среди основных механизмов ингибирующего действия пробиотических бактерий на вирусы выделяют продукцию активных метаболитов — органических кислот, бактериоцинов, бактерицидных субстратов и др., которые понижают pH среды, предотвращают адгезию вирусных частиц и обладают прямым противовирусным действием [23]. Доказано также, что противовирусным действием обладают экзополисахариды пробиотических бактерий, сортаза-зависимые пили, а также липопотеины, выделяемые клеточными стенками (LpAs), которые физически препятствуют взаи-

модействию вирусных частиц с рецепторами клеток [24]. Известно, что противовирусную активность проявляют представители видов *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* [24–26].

В нашем исследовании все компоненты жидких культур бифидобактерий были не токсичны для клеток MDCK, они не снижали жизнеспособности клеток.

На рис. 2 представлены результаты исследования противовирусной активности бифидобактерий в отношении эпидемического штамма вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) и высокопатогенного штамма A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6).

Супернатанты и клетки *B. bifidum* 1 и *B. longum* 379 не показали выраженного снижения цитопатического действия вируса гриппа на клетки MDCK. Значительную активность против обоих штаммов обнаружил лишь супернатант, полученный от центрифугирования 1 мл культуры *B. bifidum* 791. Во всех разведениях до 1:8 он подавлял размножение вирусов *in vitro*. Клетки данного штамма ингибировали репродукцию вирусов до концентрации 6·10<sup>6</sup> КОЕ/мл.

В ходе анализа генома штамма *B. bifidum* 791 установлено, что он способен продуцировать не только органические кислоты, секретируемые липопотеины и экзополисахариды, но и антибактериальные пептиды — флавуцин и лассо-пептид, относящиеся к группе термостабильных бактериоцинов I класса [16, 27]. Бактериоцины этого класса обладают широким спектром противовирусной активности, способны ингибировать все этапы репликации вирусов, блокировать их рецепторы и ферменты и предотвращать адсорбцию на эукариотических клетках [28–30]. Нами установлено, что термостабильные бактериоцины I класса являются определяющим фактором активности про-

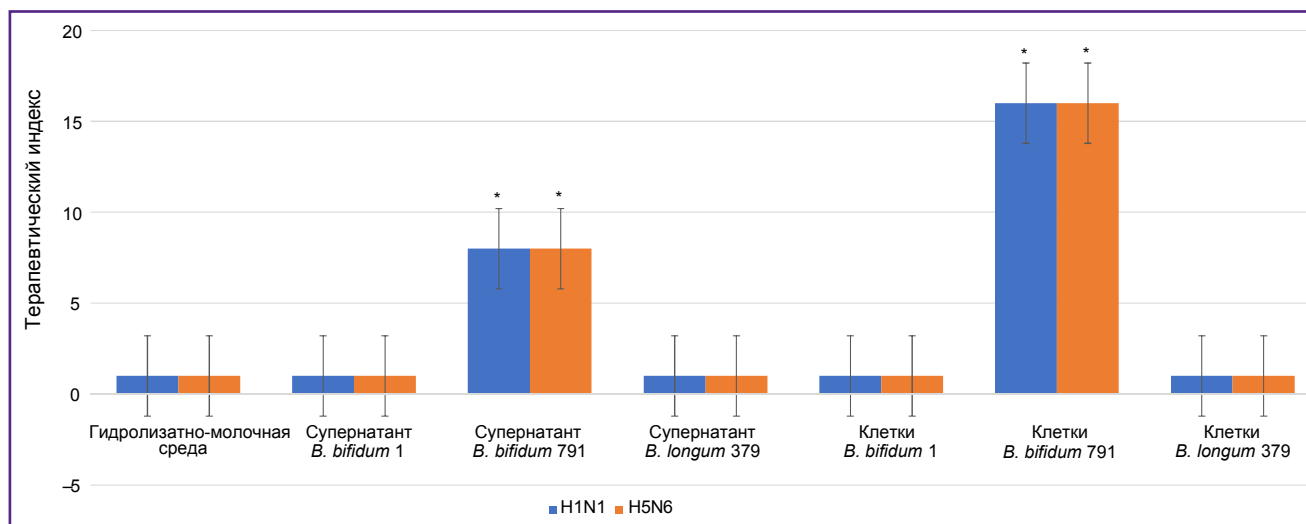


Рис. 2. Терапевтический индекс различных компонентов жидкой культуры бактерий *B. longum* 379, *B. bifidum* 1, и *B. bifidum* 791 в отношении штаммов вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) (синий) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) (оранжевый)

Результаты представляют собой средние значения ± стандартные отклонения от трех независимых экспериментов; \* p<0,05



биотических штаммов бифидобактерий против эпидемического вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6).

## Заключение

С использованием полногеномного секвенирования получены новые данные о штаммоспецифичных особенностях пробиотических бифидобактерий. Установлено, что изученные штаммы способны утилизировать углеводы растительного происхождения. В геномах штаммов *B. longum* 379 и *B. bifidum* 791, в отличие от штамма *B. bifidum* 1, обнаружены ключевые ферменты синтеза триптофана (предшественника моноаминовых нейротрансмиттеров) и фолиевой кислоты — важнейшего водорастворимого витамина. Эти вещества разносторонне влияют на организм человека, в том числе оказывают тимолептическое действие и регулируют когнитивную активность. Особенностью генома *B. bifidum* 791 является также наличие детерминант, ответственных за синтез термостабильных бактериоцинов I типа — флавуцина и лассо-пептида, обуславливающих выраженную активность данного штамма против эпидемического штамма вируса гриппа A/Lipetsk/1V/2018 (H1N1 pdm09) и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6).

**Финансирование исследования.** Исследование проводилось в рамках отраслевой научно-исследовательской программы 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней», тема НИР №21091400194-0.

**Конфликта интересов** нет.

## Литература/References

1. *Probiotics. Advanced food and health application.* Brandelli A. (editor). Academic Press; 2021; 530 p.
2. Корниенко Е.А. Метаболическое действие микробиоты и метабитоики. *Русский медицинский журнал* 2016; 18: 1196–1201.
3. Kornienko E.A. Metabolic activities of microbiota and metabiotics. *Russkij medicinskij zurnal* 2016; 18: 1196–1201.
4. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Neuromodulatory effects, targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 2016; 27: 30971, <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30971>.
5. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2019; 11(4): 1071–1085, <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09583-0>.
6. Arena M.P., Elmastour F., Sane F., Drider D., Fiocco D., Spano G., Hober D. Inhibition of coxsackievirus B4 by *Lactobacillus plantarum*. *Microbiol Res* 2018; 210: 59–64, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.008>.
7. Kim K., Lee G., Thanh H.D., Kim J.H., Konkitt M., Yoon S., Park M., Yang S., Park E., Kim W. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *J Dairy Sci* 2018; 101(7): 5702–5712, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14151>.
8. Lei S., Ramesh A., Twitchell E., Wen K., Bui T., Weiss M., Yang X., Kocher J., Li G., Giri-Rachman E., Trang N.V., Jiang X., Ryan E.P., Yuan L. High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Front Microbiol* 2016; 7: 1699, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01699>.
9. Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20(3): 333–338, <https://doi.org/10.1097/00005176-199504000-00012>.
10. Soloveva I.V., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Y., Pyankov O.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zhirnov V.A., Bormotov N.I., Skarnovich M.O., Durymanov A.G., Molodtsova S.B., Filippova E.I., Ovchinnikova A.S., Magerramova A.V., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A. Genome features and in vitro activity against influenza A and SARS-CoV-2 viruses of six probiotic strains. *Biomed Res Int* 2021; 2021: 6662027, <https://doi.org/10.1155/2021/6662027>.
11. Чеботарь И.В., Поликарпова С.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III–IV групп патогенности. *Лабораторная служба* 2018; 7(2): 78–86, <https://doi.org/10.17116/labs20187278-86>.
12. Chebotar' I.V., Polikarpova S.V., Bocharova Yu.A., Mayansky N.A. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of bacteria and fungi of the pathogenicity group III and IV. *Laboratornaa sluzhba* 2018; 7(2): 78–86, <https://doi.org/10.17116/labs20187278-86>.
13. Соловьева И.В., Новикова Н.А., Точилина А.Г., Белова И.В., Кашников А.Ю., Сашина Т.А., Жирнов В.А., Молодцова С.Б. Пробиотический штамм *Lactobacillus fermentum* 39: биохимические свойства, особенности генома, антивирусная активность. *Микробиология* 2021; 90(2): 215–222.
14. Soloveva I.V., Novikova N.A., Tochilina A.G., Belova I.V., Kashnikov A.Y., Sashina T.A., Zhirnov V.A., Molodtsova S.B. The probiotic strain *Lactobacillus fermentum* 39: biochemical properties, genomic features, and antiviral activity. *Mikrobiologiya* 2021; 90(2): 215–222.
15. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30(14): 2068–2069, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
16. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(11): 2640–2644, <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
17. Cosentino S., Voldby L.M., Moller A.F., Lund O. PathogenFinder — distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One* 2013; 8(10): e77302, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>.
18. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Møller Aarestrup F., Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder



- and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(7): 3895–3903, <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>.
16. van Heel A.J., Kloosterman T.G., Montalban-Lopez M., Deng J., Plat A., Baudu B., Hendriks D., Moll G.N., Kuipers O.P. Discovery, production and modification of 5 novel lantibiotics using the promiscuous nisin modification machinery. *ACS Synth Biol* 2016; 5(10): 1146–1154, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00033>.
17. Rossi M., Amaretti A., Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 2011; 3(1): 118–134, <https://doi.org/10.3390/nu3010118>.
18. Gabris C., Bengelsdorf F.R., Dürre P. Analysis of the key enzymes of butyric and acetic acid fermentation in biogas reactors. *Microb Biotechnol* 2015; 8(5): 865–873, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12299>.
19. Prasirtsak B., Thitiprasert S., Tolieng V., Assabumrungrat S., Tanasupawat S., Thongchul N. D-lactic acid fermentation performance and the enzyme activity of a novel bacterium *Terrilactibacillus laevilacticus* SK5–6. *Ann Microbiol* 2019; 69: 1537–1546.
20. Kang D.W., Ilhan Z.E., Isem N.G., Hoyt D.W., Howsmon D.P., Shaffer M., Lozupone C.A., Hahn J., Adams J.B., Krajmalnik-Brown R. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe* 2018; 49: 121–131, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.007>.
21. Vlasenko V.A., Ilyicheva T.N., Teplyakova T.V., Svyatchenko S.V., Asbaganov S.V., Zmitrovich I.V., Vlasenko A.V. Antiviral activity of total polysaccharide fraction of water and ethanol extracts of *Pleurotus pulmonarius* against the influenza A virus. *Curr Res Environ Appl Mycol* 2020; 10(1): 224–235, <https://doi.org/10.5943/cream/10/1/22>.
22. Morita N., Umemoto E., Fujita S., Hayashi A., Kikuta J., Kimura I., Haneda T., Imai T., Inoue A., Mimuro H., Maeda Y., Kayama H., Okumura R., Aoki J., Okada N., Kida T., Ishii M., Nabeshima R., Takeda K. GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1<sup>+</sup> cells by bacterial metabolites. *Nature* 2019; 566(7742): 110–114, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0884-1>.
23. Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Фураева В.А. Противовирусный эффект in vitro метаболитов, выделяемых культурами энтерококка и лактобацилл. В кн.: *Материалы VI Российского съезда врачей инфекционистов*. М; 2003; с. 371.
24. Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Furaeva V.A. Protivovirusnyy effekt in vitro metabolitov, vydelyaemykh kul'turami enterokokka i laktobatsill. V kn.: *Materialy VI Rossiyskogo s'ezda vrachey infektsionistov* [Antiviral effect in vitro of metabolites secreted by cultures of enterococcus and lactobacilli. In: Proceedings of the VI Russian congress of infectious disease physicians]. Moscow; 2003; p. 371.
25. El Kfoury K.A., Romond M.B., Scutto A., Alidjinou E.K., Dabboussi F., Hamze M., Engelmann L., Sane F., Hober D. Bifidobacteria-derived lipoproteins inhibit infection with coxsackievirus B4 in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50(2): 177–185, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.010>.
26. Kang J.Y., Lee D.K., Ha N.J., Shin H.S. Antiviral effects of *Lactobacillus ruminis* SPM0211 and *Bifidobacterium longum* SPM1205 and SPM1206 on rotavirus-infected Caco-2 cells and a neonatal mouse model. *J Microbiol* 2015; 53(11): 796–803, <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5302-2>.
27. Olaya Galán N.N., Ulloa Rubiano J.C., Velez Reyes F.A., Fernandez Duarte K.P., Salas Cárdenas S.P., Gutierrez Fernandez M.F. In vitro antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production. *J Appl Microbiol* 2016; 120(4): 1041–1051, <https://doi.org/10.1111/jam.13069>.
28. Lu W., Pei Z., Zang M., Zhao J., Chen W., Wang H., Zhang H. Comparative genomic analysis of *Bifidobacterium bifidum* strains isolated from different niches. *Genes (Basel)* 2021; 12(10): 1504, <https://doi.org/10.3390/genes12101504>.
29. Tiwari S.K., Dicks L.M.T., Popov I.V., Karaseva A., Ermakov A.M., Suvorov A., Tagg J.R., Weeks R., Chikindas M.L. Probiotics at war against viruses: what is missing from the picture? *Front Microbiol* 2020; 11: 1877, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01877>.
30. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O.P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(7): 2939–2951, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>.
31. Maksimov M.O., Pan S.J., James Link A. Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep* 2012; 29(9): 996–1006, <https://doi.org/10.1039/c2np20070h>.