

возможна без образования тесных пара- и аутокринных отношений между эу- и прокариотическими клетками. Вероятно, это является отражением того, что такой или подобный эндосимбиоз имел место и в процессе эволюции при возникновении

эукариотических клеток в результате длительного симбиотического сосуществования различных про- и эукариотических клеток, а также в процессе последующих филогенетических преобразований про- и эукариотических организмов.

### Литература

1. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я. Бактерионосительство. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 1996. 220 с. [Bukharin O.V., Usvyatsov B.Y. *Bacteriocarrier*. Ekaterinburg: Izd. UD RAS, 1996. 220 p.]
2. Козлова А.Н., Стадников А.А., Ковбык Л.В., Шевлюк Н.Н. Структурно-функциональная реорганизация стафилококков и воздухоносной системы при интратрахеальном введении патогена в эксперименте // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 4. С. 55–58. [Kozlova A.N., Stadnikov A.A., Kovbyk L.V., Shevlyuk N.N. Structural and functional reorganization of staphylococci and airway system with intratracheal introduction of the pathogen in the experiment // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2003. № 4. P. 55–58].
3. Стадников А.А., Чернова О.Л., Ковбык Л.В., Шевлюк Н.Н., Бухарин О.В. Роль гипоталамических нонапептидов во взаимодействии про- и эукариотических клеток // Вестник РАМН. 2000. № 2. С. 49–52. [Stadnikov A.A., Chernova O.L., Kovbyk L.V., Shevlyuk N.N., Bukharin O.V. The role of hypothalamic nonapeptides in the interaction of pro- and eukaryotic cells // *Vestnik RAMS*. 2000. № 2. P. 49–52].
4. Стадников А.А., Бухарин О.В. Гипоталамическая нейросекреция и структурно-функциональный гомеостаз про- и эукариот (морфологические основы реактивности, пластичности, регенерации). Оренбург: Изд-во ОрГМА, 2012. 296 с. [Stadnikov A.A., Bukharin O.V. *Hypothalamic neurosecretion and structural and functional homeostasis of pro- and eukaryotes (morphological basis of reactivity, plasticity, regeneration)*. Orenburg: Publishing house OrgMA, 2012. 296 p.]
5. Ammons M.C., Copiñ V. Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic // *Biofouling*. 2013. Vol. 29, № 4. P. 443–455.
6. Muscedere J., Maslove D., Boyd J.G., O'Callaghan N., Lamontagne F., Reynolds S., Albert M., Hall R., McGolrick D., Jiang X., Day A.G. Prevention of nosocomial infections in critically ill patients with lactoferrin (PREVAİL study): study protocol for a randomized controlled trial // *Trials*. 2016. Vol. 17, № 1. P. 474.

## ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ *L. HELVETICUS* D75 И *L. HELVETICUS* D76 И ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КЛАСТЕРОВ СИНТЕЗА БАКТЕРИОЦИНОВ

В.А. Торопов, О.Н. Шалаева, Е.К. Рощина, Т.Я. Вахитов, С.И. Ситкин  
Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов,  
Санкт-Петербург, Корпусная ул., д. 28, лит. А, e-mail: vtoropov.92@mail.ru

## WHOLE-GENOME SEQUENCING OF PROBIOTIC BACTERIA *L. HELVETICUS* D75 AND *L. HELVETICUS* D76 AND DETECTION OF GENETIC CLUSTERS OF BACTERIOCINS SYNTHESIS

V.A. Toropov, O.N. Shalaeva, Ye.K. Roshchina, T.Ya. Vakhitov, S.I. Sitkin  
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Korpusnaya str., house 28,  
letter A, e-mail: vtoropov.92@mail.ru

В медицинской практике для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ применяется множество различных пробиотических препаратов. Наиболее эффективными являются препараты, созданные на основе симбиотических ассоциаций

пробиотических бактерий [1]. Для создания новых и улучшения уже существующих симбиотических бактериальных препаратов необходима информация об устройстве геномов, метаболизме и уровне экспрессии генов бактерий, входящих в их состав.

Для получения полных нуклеотидных последовательностей геномов пробиотических штаммов *Lactobacillus helveticus* D75 и *Lactobacillus helveticus* D76, входящих в состав симбиотического пробиотического комплекса Витафлор®, было проведено полногеномное секвенирование по технологии SMRT PacBio RS II (лаборатория Macrogen, Республика Корея). Сборка геномов *de novo* осуществлялась по методу HGAP (программа SMRT Portal v. 2.3.0) [2].

Библиотеки прочтений для исследуемых штаммов состоят из 92790 прочтений для штамма *L. helveticus* D75 и 77334 прочтений для штамма *L. helveticus* D76. Значение N50 для библиотек прочтений соответствует 23 981 паре оснований (п.о.) и 18 990 п.о. для штаммов *L. helveticus* D75 и D76 соответственно. Протяженность собранных геномов составляет 2053066 п.о. (покрытие прочтениями  $\times 422,69$ ) для штамма *L. helveticus* D75 и 2058319 п.о. (покрытие прочтениями  $\times 375$ ) для штамма *L. helveticus* D76. В составе генома *L. helveticus* D75 обнаружено 2092 гена: 317 псевдогенов, 1693 белок-кодирующих гена, 15 генов рРНК, 64 гена тРНК и 3 других гена РНК. В составе генома *L. helveticus* D76 обнаружено 2097 генов: 321 псевдоген, 1694 белок-кодирующих гена, 15 генов рРНК, 64 гена тРНК и 3 других гена РНК.

В геномах штаммов *L. helveticus* D75 и D76 обнаружено по 3 генетических блока CRISPR-кассет. Данные генетические структуры повышают устойчивость исследуемых штаммов к бактериофагам. Большое количество псевдогенов связано со значительной редукцией геномов штаммов *L. helveticus* D75 и D76 в результате активного использования в биотехнологическом производстве, включающем рост на богатых питательных средах.

В ходе генетического анализа методами биоинформатики проведена точная видовая классификация штаммов D75 и D76, позволяющая отнести их к виду *L. helveticus*, а не к виду *L. acidophilus* как считалось ранее. При помощи анализа средней нуклеотидной идентичности (ANI) осуществлена генетическая классификация геномов исследуемых штаммов в базе данных National Center for Biotechnology Information

(NCBI) с последующим подтверждением полученных результатов в программе JSpecies. Для программы JSpecies в качестве референсных штаммов были выбраны штаммы *L. helveticus* DPC4571, *L. helveticus* R0052, *L. helveticus* CNRZ 32, *L. helveticus* H9, *L. helveticus* H10, *L. helveticus* CAUH18, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* La-14, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* 4796, *L. acidophilus* CFH, *L. acidophilus* FSI4 и *L. acidophilus* WG-LB-IV.

Ранее у штаммов *L. helveticus* D75 и D76 микробиологическими и биохимическими методами была обнаружена специфическая антагонистическая активность против патогенных штаммов бактерий [3]. В настоящей работе обнаружен каскад генов синтеза бактериоцина гельветицина J, вносящих существенный вклад в проявление данного пробиотического свойства у штаммов *L. helveticus* D75 и D76.

Методом ПЦР в реальном времени показан индуцибельный характер синтеза гельветицина J у исследуемых штаммов. При культивировании штаммов *L. helveticus* D75 и D76 добавление в среду роста модельной смеси карбоновых кислот, их солей и аминокислот (препарат Актофлор-С®) приводит к усилению их антагонистической активности против патогенных тест-культур *Escherichia coli* O75 и *Salmonella enteritidis* 209. Одновременно с усилением антагонизма наблюдается увеличение экспрессии генов, принимающих участие в синтезе бактериоцина гельветицина J.

В результате исследования были получены полные нуклеотидные последовательности замкнутых кольцевых геномов штаммов *L. helveticus* D75 и D76 (идентификационные номера в базе данных NCBI — CP020029.1 и CP016827.1 соответственно). Установлена точная видовая принадлежность исследуемых штаммов к виду *L. helveticus*. Выявлен индуцибельный характер синтеза бактериоцина гельветицина J у штаммов *L. helveticus* D75 и D76.

На основании полученных данных выдвинуто предположение о том, что филогенетическое расхождение между двумя близкородственными бактериальными штаммами *L. helveticus* D75 и D76 произошло сравнительно недавно.

### Литература

1. Flesch A.G., Poziomyck A.K., Damin D.C. The therapeutic use of symbiotics // ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. 2014. Vol. 27 (3). P. 206–209.
2. Chin C.S., Alexander D.H., Marks P., Klammer A.A., Drake J., Heiner C., Clum A., Copeland A., Huddleston J., Eichler E.E., Turner S.W., Korlach J. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data // Nat. Methods. 2013. Vol. 10 (6). P. 563–569. doi: 10.1038/nmeth.2474.
3. Вахитов Т.Я., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Полевая Е.В., Кобатов А.И. Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на антагонистическую активность *Lactobacillus acidophilus* Д№75 // Научный журнал КубГАУ. 2013. № 92 (08). С. 1–19. URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/08/pdf/22.pdf>. [Vakhitov T.Y., Verbitskaya N.B., Dobrolez O.V., Polevaya E.V., Kobatov A.I. The effect of probiotic and pathogenic bacteria metabolites on antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* D№75 // Nauchnyy zhurnal KubGAU. 2013. № 92 (08). P. 1–19.]