

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

© 2024 г. К. В. Моисеенко^а, О. А. Глазунова^а, О. С. Савинова^а, Т. В. Федорова^{а, *}

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 25.10.2023 г.

Штаммы *Streptococcus thermophilus* широко используются как заквасочные культуры. Поиск новых безопасных штаммов с желаемыми производственными и пробиотическими свойствами является актуальным. Проведено полногеномное секвенирование, установлены основные характеристики геномов двух новых штаммов *S. thermophilus* 16t (Str16t) и 159 (Str159). *In silico* анализ геномов показал отсутствие трансмиссивных генов антибиотикорезистентности, генов патогенности и вирулентности, интегрированных плазмид, а также обнаружены генные кластеры бактериоцинов I и II класса. В *in vitro* тестах оба штамма показали фосфатазную, пептидазную, β-галактозидазную и эстеразную активности, а также ферментировали глюкозу, лактозу, сахарозу и рибозу, штамм Str16t дополнительно метаболизировал маннозу. Str16t и Str159 являются перспективными для использования как заквасочные и пробиотические культуры.

Ключевые слова: *Streptococcus thermophilus*, пробиогеномика, антибиотикорезистентность, углеводный профиль, метаболизм углеводов

DOI: 10.31857/S0026365624030106

Streptococcus thermophilus — грамположительная молочнокислая бактерия, широко используемая в качестве заквасочной культуры в молочной промышленности для изготовления йогуртов и ряженки, а также многих традиционных ферментированных продуктов. Этот вид молочнокислых бактерий в последние десятилетия привлекает широкий интерес исследователей из-за его широкого промышленного использования. Помимо своей технологической важности, в последние годы термофильный стрептококк вызывает интерес и как пробиотическая культура благодаря своим функциональным свойствам, способствующим укреплению здоровья человека. Показано, что некоторые штаммы *S. thermophilus* обладают различными пробиотическими свойствами (Vitetta et al., 2019), включая антиоксидантную (Roux et al., 2022), антимикробную (Evivie et al., 2017; Uriot et al., 2017), гипотензивную (Sebastián-Nicolas et al., 2021) активности. Тем не менее, многие из описанных сегодня в литературе свойств являются штамм специфическими характеристиками.

Целью данного исследования было инвентаризировать безопасность и пробиотические свойства

двух штаммов *S. thermophilus* и изучить их внутри-видовые различия на геномном уровне.

В работе использовали 2 штамма термофильного стрептококка *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 16t (MN994627) и 159 (MN994626) из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ). Для культивирования использовали стерильное восстановленное обезжиренное молоко, микробиологические среды М17-бульон и М17-агар (“HiMedia”, Индия). Штаммы культивировали в аэробных условиях при температуре 37°C.

Для выделения ДНК штаммы *S. thermophilus* статически культивировали в 20 мл жидкой среды М17 при температуре (37 ± 1)°C до появления видимой опалесценции. 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).

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 (эквимолярно смешанных ДНК-библиотек) проводили с использованием персональной геномной машины Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (“Thermo Fisher Scientific”, Массачусетс, США).

Сборку геномов *de novo* осуществляли 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), а также с использованием eggNOG, SignalP и SecretomeP онлайн интернет-сервисов. Геномы были депонированы в базу данных GenBank: *S. thermophilus* 16t (BioProject: PRJNA824719; JAMWGM01; ASM2389367v1) и *S. thermophilus* 159 (BioProject: PRJNA736961; JAHXJ01; ASM1896690v1). Сравнительный геномный анализ проводили с использованием программного пакета Anvi'o.

Поиск мобильных генетических элементов осуществлялся с помощью программы ISfinder, поиск профагов — с помощью программы PHASTER, поиск плазмид — с помощью программы PlasmidFinder. Анализ наличия переносимых генов антибиотикорезистентности в полученных геномах проводился с помощью программ Resistance Gene Identifier и ResFinder 4.1. Анализ наличия генов факторов вирулентности проводился с помощью программ VirulenceFinder и PathogenFinder. Анализ наличия бактериоцин-кодирующих генов в полученных геномах проводился с помощью программы BAGEL4. Аннотацию метаболических путей проводили с помощью базы данных KEGG Pathway.

Углеводный и ферментативный профили исследовали с использованием тест-систем API 50CHL и API ZYM соответственно (“Bio-Merieux”, Франция).

Антибиотическую резистентность штаммов лактобактерий анализировали дискодиффузным методом с помощью набора дисков (“DI-PLS-50-01, N1CF”, Санкт-Петербург, Россия), пропитанных различными видами антибиотиков. Диски накладывались на плотную питательную среду, засеянную культурой исследуемого штамма, после чего осуществляли культивирование в течение 24–48 ч при температуре 37°C и последующее измерение диаметра зоны задержки роста вокруг дисков.

Секвенирование и аннотирование геномов. С помощью технологии Ion Torrent были получены черновые геномные последовательности (ЧГП),

Таблица 1. Данные по секвенированию и аннотированию геномов *Streptococcus thermophilus* 16t (Str16t) и 159 (Str159)

Параметр	Str16t GCA_023893675.1	Str159 GCA_018966905.1
Секвенирование		
Число прочтений	4247 270	2851 726
Среднее прочтение	208 п.о.	209 п.о.
Сборка		
Размер сборки, п.о.	1810 221	1805 641
Среднее покрытие	100×	100×
Число контигов	76	75
Самый длинный контиг, п.о.	219248	217358
N50, п.о.	91841	100972
Средний размер контига, п.о.	23519	27766
Структурная аннотация		
Гены (всего):	1909	1914
Кодирующие белки	1619	1607
Кодирующие РНК	63	61
Псевдогены	227	246
CRISPR-регион	2	2

англ. draft genome sequences) *S. thermophilus* 16t и *S. thermophilus* 159 (табл. 1).

Для обеих ЧГП покрытие составляло более 100×, а конечное число контигов 76 и 75 соответственно. Несмотря на отличающиеся почти в два раза число полученных прочтений, в целом характеристики обеих ЧГП были сходны — N50 контигов составляли около 100 к.п.о., а самые длинные контиги были в районе 220 к.п.о. В целом, полученные ЧГП имели сопоставимое качество с ранее опубликованными ЧГП других штаммов *S. thermophilus*.

Стабильность геномов. Стабильность генома заквасочных и пробиотических культур лактобактерий является крайне важным параметром для их успешного промышленного применения. Чем стабильней геном микроорганизма, тем меньше вероятность вырождения его культуры, проявляющаяся в утере ряда пробиотических свойств и технически полезных качеств. В связи с вышесказанным, в полученных геномах *S. thermophilus* был проведен поиск таких основных маркеров стабильности генома, как мобильные генетические элементы, профаги и плазмиды. Результаты проведенного поиска основных маркеров стабильности генома суммированы в табл. 2. В целом оба штамма показали сходную стабильность геномов.

Сравнение геномов. Для выявления специфических геномных особенностей изучаемых штаммов *S. thermophilus*, был проведен сравнительный геномный анализ (рис. 1). Было обнаружено 3083

Таблица 2. Маркеры геномной стабильности в геномах *S. thermophilus* 16t и 159

Штамм	Число мобильных элементов IS, шт.	Число профагов, шт.			Плазмиды, шт.
		Полные	Под вопросом	Неполные	
16t	41	0	0	1	0
159	41	0	0	2	0

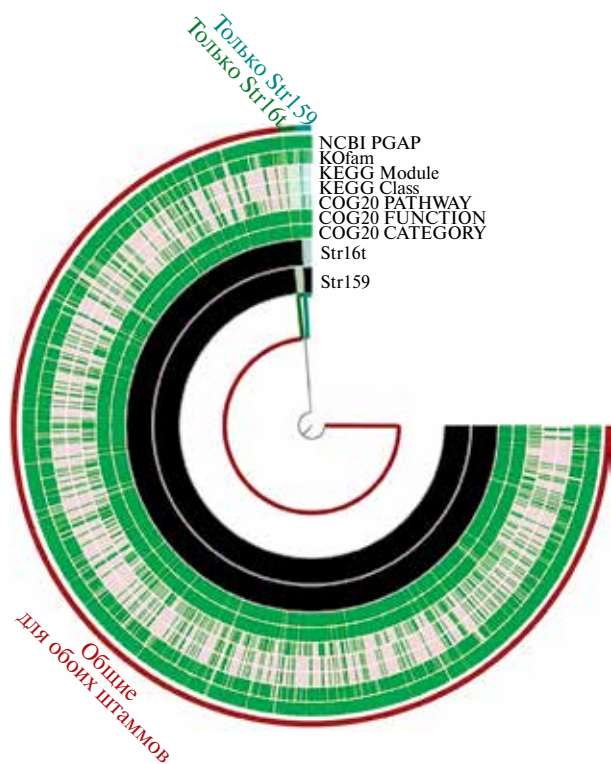


Рис. 1. Диаграмма Anvi'o, представляющая сравнительный геномный анализ штаммов *S. thermophilus* 16t (Str16t) и *S. thermophilus* 159 (Str159). Кластеры генов (два внутренних кольца) были упорядочены (внутренняя дендрограмма) в зависимости от их присутствия (сплошной цвет) или отсутствия (серый цвет) в геномах каждого штамма. Наличие у каждого кластера генов функциональных аннотаций указано зеленым цветом на кольце, подписанном в соответствии с типом аннотации.

генных кластера, общих для обоих геномов. Для штамма *S. thermophilus* 16t было выявлено 18 штаммоспецифических генных кластеров, а для штамма *S. thermophilus* 159—19.

Гены факторов вирулентности. Анализ факторов вирулентности показал, что вероятность анализируемых штаммов *S. thermophilus* стимулировать развитие патогенных процессов в организме человека, как непосредственно, так и опосредовано, через обмен генами с другими микроорганизмами оценивается ниже 0.1%.

Антибиотикорезистентность. Анализ антибиотикорезистентности штаммов *S. thermophilus*, при тестировании диско-диффузионным методом (ДДМ), показал наличие резистентности к фосфомицину у штамма 16t и к амоксицилину с канамицином у штамма 159, к остальным группам антибиотиков была показана либо чувствительность, либо промежуточная чувствительность (рис. 2).

В результате *in silico* анализа драфта геномов *S. thermophilus* не выявлено наличия известных трансмиссивных генов антибиотикорезистентности (AR), способных передаваться путем горизонтального генетического транспорта, таких как AR-гены устойчивости к: аминогликозидам (*aac(6')-aph(2'')*) и *aad(E)*; тетрациклинам (*tet(M)*, *tet(W)*, *tet(T)*, *tet(K)* и *tet(L)*); амфениколам (*cat*); макролидам и линкозамидам (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(T)* и *mef(A)*). В обоих геномах обнаружены детерминанты антибиотикорезистентности к β-лактамам. Они распознаны как β-лактамазы классов A (PenP) и C (AmpC), являющихся

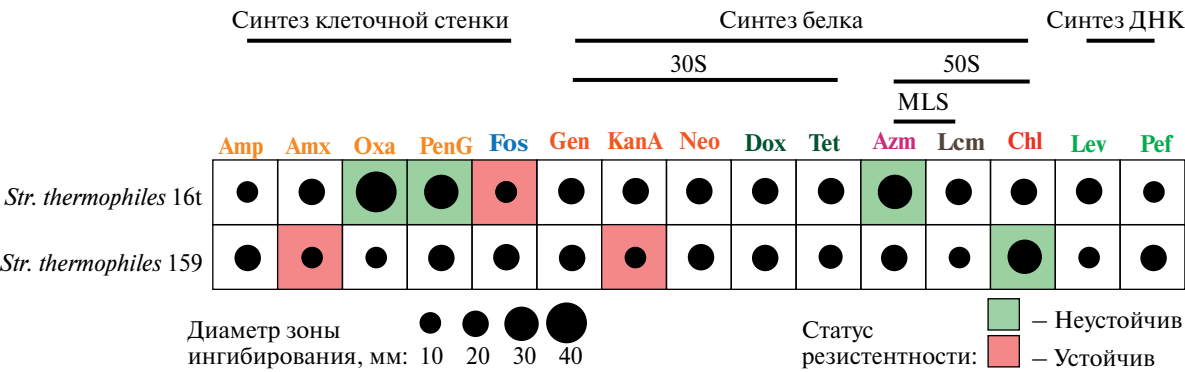


Рис. 2. Устойчивость штаммов *S. thermophilus* к различным группам антибиотиков: β-лактамы (Amp — ампициллин, Amx — амоксициллин, Oxa — оксациллин, PenG — пенициллин G); Fos — фосфомицин; Аминогликозиды (Gen — гентамицин, KanA — канамицин A, Neo — неомицин); Тетрациклины (Dox — доксициклин, Tet — тетрациклин); Макролиды (Azm — азитромицин); Линкозамиды (Lcm — линкомицин); Амфениколы (Chl — хлорамфеникол); Фторхинолоны (Lev — левофлоксацин, Pef — пефлоксацин).

сериновыми β -лактамазами, а также различные металло- β -лактамазы класса В. В тоже время устойчивость к фосфомицину у штамма Str16t и к канамицину А у Str159, показанная методом ДДМ, обусловлена, вероятно, наличием молекулярных эффлюксных помп семейства MacB, а также эффлюксных помп семейств MATE (1 ген только в геноме 16t), SMR (по 1 гену в обоих геномах) и MFS (9 и 10 генов в геномах Str16t и Str159 соответственно), которые могут обуславливать устойчивость бактерий к различным антимикробным препаратам.

Кластеры бактериоцинов. Антимикробная активность является одним из наиболее хорошо известных свойств потенциально пробиотических штаммов. Бактериоцины представляют собой рибосомально-синтезируемые пептиды, обладающие антимикробной активностью. Известно, что штаммы *S. thermophilus* могут продуцировать бактериоцины с ингибирующей активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, включая такие, как *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Clostridium butyricum*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus cereus*, *Gardnerella vaginalis* и *Escherichia coli* (Evivie et al., 2017, Uriot et al., 2017, Roux et al., 2022).

In silico анализ показал наличие четырех одинаковых генных кластеров бактериоцинов в геномах *S. thermophilus* (табл. 3).

Они были аннотированы как: (1) *Lab* — кластер, кодирующий бактериоцин лантипептид из класса лантибиотиков; (2) *Blp* — кодирующий 5 циклических бактериоциноподобных пептидов II класса, включая *blpD*, *blpU* и *blpK*; (3) кластер генов, участвующих в биосинтезе сактипептида, характеризующегося наличием связей между атомом серы цистеинового остатка и α -углеродным атомом другой аминокислоты из группы RiPPs (рибосомно синтезируемые посттрансляционно модифицированные пептиды); (4) кластер генов, кодирующих биосинтез стрептида также из группы RiPPs, который представляет собой макроциклический пептид, образующийся в результате внутримолекулярной

сшивки Lys-Trp с участием фермента (KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase, kwcM) из семейства rSAM (radical SAM enzymes), катализирующих радикальные реакции с участием S-аденозилметионина (SAM). Наличие в геномах Str16t и Str159 кластеров бактериоцинов свидетельствует о потенциальных противомикробных свойствах штаммов, но в дальнейшем необходимы эксперименты *in vitro* для демонстрации подобной активности.

Углеводный профиль и гены углеводного метаболизма. Углеводный обмен способствует колонизации лактобактерий в пищеварительном тракте организма хозяина, что является важным пробиотическим фактором. Предполагается, что утилизация глюкозы и лактозы является общей характеристикой изученных на сегодняшний день штаммов *S. thermophilus*, в то время как утилизация галактозы, рибозы, маннозы, мальтозы, мелибиозы, раффинозы и сахарозы имеет варибельный профиль (Zhao et al., 2023). В нашем исследовании оба штамма *S. thermophilus* сбраживали глюкозу, лактозу, сахарозу и рибозу, и были не способны утилизировать остальные сахара, за исключением маннозы, которую Str16t утилизировал, в отличие от Str159 (рис. 3а).

Детальный анализ кластеров геномов, отвечающих за утилизацию лактозы/галактозы, позволил выявить некоторые структурные особенности: (1) наличие генов, кодирующих ферменты Лелуар-пути — β -галактозидазу *lacZ*, оперон *GalkTEM* (галактокиназа *galK*, галактозо-1-фосфат уридилилтрансфераза *galT*, УДФ-глюкозо-4-эпимераза *galE* и галактозмутаротаза *GalM*), фосфоглюкомутазу *PgmA*; (2) отсутствие генов тагатоза-6-фосфатного пути (Т6Р). При этом в геномах Str16t и Str159 обнаружена специфичная для лактозы пермеаза *LacS* и отсутствуют специфичные транспортные системы для лактозы/галактозы, такие как фосфоенолпируватная транспортная система (PTS) *LacEF* и пермеаза *GalP*. Также обнаружены гены PTS для сахарозы (*ScrA*), маннозы (*ManXYZ*) и фруктозы (*FruA/B*). Интересно, что при наличии генов транспортных систем и ферментов для утилизации маннозы и фруктозы, фенотип обоих штаммов Str16t и Str159 Mal[–], а у штамма Str159 также

Таблица 3. Кластеры бактериоцинов, предсказанные в геномах *S. thermophilus* 16t и 159

Кластер	Бактериоцин	Класс*
<i>Blp</i>	ComC/Бактериоцин	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpD	Пс
	ComC/Бактериоцин	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpU	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpK	Пс
<i>Str</i> (Streptide LMD-9)	Стрепид	I (RiPPs)
Sactipeptide	Сактипептид	I (RiPPs)
<i>Lab</i>	Лантипептид	I (RiPPs)

*Классификация бактериоцинов в соответствии с (Soltani et al., 2021).

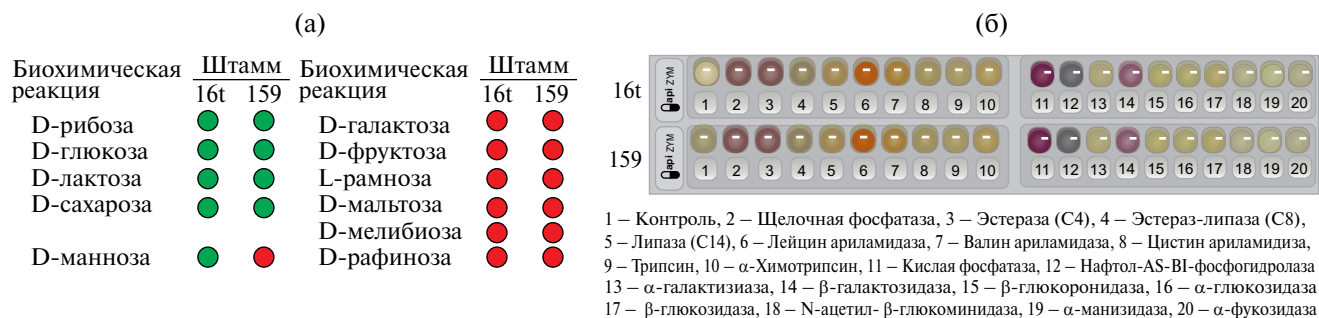


Рис. 3. Биохимическая характеристика *S. thermophilus* 16t и 159: а – оценка способности к ферментации углеводов (зеленый цвет – реакция положительная, красный – отрицательная); б – ферментативный профиль.

фенотип Map– (рис. 3а). Слабовыраженная сахаролитическая активность исследуемых штаммов *S. thermophilus* коррелирует с отсутствием активности соответствующих гликозид гидролаз (рис. 3б). Также не было установлено наличие в геномах *S. thermophilus* 16t и 159 известных специфичных для моно- и олигосахаридов ABC-транспортеров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 22-16-00108.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовали люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Evivie S. E., Li B., Ding X., Meng Y., Yu S., Du J., Xu M., Li W., Jin D., Huo G., Liu F. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* KLD3.1003, a strain with high antimicrobial potential against foodborne and vaginal pathogens // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01238>

Roux E., Nicolas A., Valence F., Siekaniec G., Chuat V., Nicolas J., Le Loir Y., Guédon E. The genomic basis of the *Streptococcus thermophilus* health-promoting properties // *BMC Genomics.* 2022. V. 23. Art. 210. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08459-y>

Sebastián-Nicolas J. L., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Cruz-Guerrero A. E., Rodríguez-Serrano G. M., Añorve-Morga J., Jaimez-Ordaz J., Castañeda-Ovando A., Pérez-Escalante E., Ayala-Niño A., González-Olivares L. G. Milk fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: proteolytic profile and ACE-inhibitory activity // *Fermentation.* 2021. V. 7. Art. 215. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040215>

Soltani S., Hammami R., Cotter P. D., Rebuffat S., Ben Said L., Gaudreau H., Bédard F., Biron E., Drider D., Fliss I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>

Uriot O., Denis S., Junjua M., Roussel Y., Dary-Mouro A., Blanquet-Diot S. *Streptococcus thermophilus*: from yogurt starter to a new promising probiotic candidate? // *J. Funct. Foods.* 2017. V. 37. P. 74–89.

Vitetta L., Llewellyn H., Oldfield D. Gut dysbiosis and the intestinal microbiome: *Streptococcus thermophilus* a key probiotic for reducing uremia // *Microorganisms.* 2019. V. 7. Art. 228.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7080228>

Zhao R., Chen Z., Liang J., Dou J., Guo F., Xu Z., Wang T. Advances in genetic tools and their application in *Streptococcus thermophilus* // *Foods.* 2023. V. 12. Art. 3119. <https://doi.org/10.3390/foods12163119>

Comparative Genome Analysis and Assessment of the Functional Properties of *Streptococcus thermophilus* Strains

K. V. Moiseenko¹, O. A. Glazunova¹, O. S. Savinova¹, and T. V. Fedorova^{1, *}

¹*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: fedorova_tv@mail.ru*

Received October 13, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 25, 2023

Abstract—*Streptococcus thermophilus* are commonly used as starter cultures. Search for new safe strains with desired industrial and probiotic properties is an important issue. Complete genome sequencing was carried out, and the main genome characteristics of two new strains, *S. thermophilus* 16t (Str16t) and 159 (Str159), were determined. *In silico* analysis of the genomes revealed the absence of transmissible antibiotic resistance genes, virulence genes associated with pathogenicity, and integrated plasmids; gene clusters encoding class I and class II bacteriocin were found. *In vitro* tests showed phosphatase, peptidase, β -galactosidase, and esterase activity of both strains, as well as their ability to ferment glucose, lactose, sucrose, and ribose. Strain Str16t metabolized mannose as well. Str16t and Str159 are promising strains for application as starter and probiotic cultures.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, probiogenomics, antibiotic resistance, carbohydrate profile, carbohydrate metabolism