

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Дин Фань

Дин Фань

**Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен
разного происхождения**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители: **Нетрусов Александр Иванович,**
доктор биологических наук, профессор

Стоянова Лидия Григорьевна,
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Градова Нина Борисовна,**
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО
«Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева», факультет биотехнологии и
промышленной экологии, кафедра биотехнологии,
ведущий научный сотрудник

Ушакова Нина Александровна,
доктор биологических наук, ФГБУН Институт проблем
экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
заведующая лабораторией инновационных технологий,
главный научный сотрудник

Качалкин Алексей Владимирович,
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра
биологии почв, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится *18 мая 2023 г. в 15:00 часов* на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: *nvkostina@mail.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2505>

Автореферат разослан «14» апреля 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Кефирные зерна (КЗ) - это закваска, используемая для производства кефирного напитка, получаемого путем сбраживания цельного или обезжиренного коровьего молока. Эти зерна содержат сложное симбиотическое сообщество молочнокислых бактерий (МКБ) и дрожжей, заключенных в матрице полисахаридов и белков. Многочисленные комбинации этих микроорганизмов на уровне видов приводят к получению домашних кефиров с уникальными характеристиками. Кефир отличается от других кисломолочных продуктов тем, что не является результатом метаболической активности одного или родственных видов микроорганизмов, а производится с использованием сложного, естественно сложившегося микробного сообщества, называемого кефирными зернами.

На протяжении веков кефиру приписывали многие полезные свойства, его даже употребляли в качестве натурального лекарства (Amorim, 2019). Микроорганизмы, присутствующие в кефире, обладают пробиотическим потенциалом, демонстрируют высокую устойчивость к низкому рН и солям желчи в желудочно-кишечном тракте и способны прилипать к кишечной слизи (Garrote, 2010). Кроме того, микробиота, присутствующая в кефире, может продуцировать антагонистические вещества, такие как: органические и жирные кислоты, бактериоцины, а также, благодаря наличию экзополисахаридов (кефиранов) препятствовать прилипанию патогенных бактерий к слизистой оболочке кишечника, потенциально способствуя улучшению здоровья кишечника. Кефир вызывает интерес в научном сообществе благодаря своим полезным свойствам, способности улучшать пищеварение, толерантности к стрессовым условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), антибактериальному, гипохолестеринемическому эффекту, контролю уровня глюкозы в плазме, антигипертензивному и противовоспалительному эффектам, антиоксидантной, антиканцерогенной и антиаллергенной активностям (Boyoglu-Barnum et al., 2019).

КЗ содержат широкий спектр микробных видов. Различные сообщения свидетельствуют о том, что микробный состав КЗ зерна сильно зависит от происхождения зерна, местных условий культивирования, процессов хранения и переработки (Miao et al., 2016). Микроорганизмы, присутствующие в кефире, обладают потенциалом пробиотиков. Основными продуктами ферментации кефира являются молочная кислота, этанол и CO₂, которые придают этому напитку кислотность и низкое содержание алкоголя. Также могут быть найдены второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, влияющие на органолептические показатели.

В настоящее время увеличился спрос на кефир во многих регионах мира (Faraq et al., 2020). В научных лабораториях возрос интерес к изучению свойств кефира, КЗ и кефирана для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств. Хотя изучение КЗ ведут уже в течение длительного времени (Lopitz-Otsoa et al., 2006), до сих пор остаются без ответа много вопросов,

касающихся микробного состава, трофических взаимоотношений компонентов и биотехнологического потенциала сообществ КЗ. Точный микробный состав КЗ до сих пор остается спорным, поскольку микробиом КЗ зависит от условий культивирования и территориального происхождения.

Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как высокопроизводительные технологии секвенирования, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного сообщества КЗ.

Цель и задачи работы. Целью работы является изучение морфологии, физиологии и микробиома КЗ из разных территориальных зон.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение морфологии КЗ из разных регионов, установление пространственного расположения микроорганизмов в их структуре;
2. Биотехнологические показатели кефиrow, приготовленных на КЗ из разных территориальных зон: время культивирования, накопление биомассы в динамике ферментации, антимикробный спектр действия.
3. Определение доминирующего состава бактерий и дрожжей в микробиоме КЗ из разных регионов;
4. Выделение и идентификация лактобацилл и дрожжей из КЗ, изучение их морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов.
5. Изучение адгезионной способности выделенных микроорганизмов как пробиотического показателя для создания эффективных функциональных продуктов и пробиотиков.
6. Сравнение свойств исследованных КЗ и выявление наиболее эффективных заквасок.

Объектами исследования являлись КЗ домашних хозяйств из разных регионов исторического происхождения: Москвы, Осетии и Китая (провинция Тибет). Предметом исследования являлись морфология, физиология и микробиом КЗ из разных территориальных зон.

Научная новизна работы. Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования генома показано филогенетическое разнообразие микроорганизмов в микробиоме КЗ из разных территориальных зон их исторического происхождения (Кавказ, Тибет и Россия), установлены их отличия по бактериальному и дрожжевому составу.

В лабораторных условиях изучены биотехнологические характеристики кефиrow, приготовленных на КЗ из разных регионов: скорость увеличения биомассы закваски в процессе ферментации молока, антимикробный спектр воздействия на разные таксономические группы микроорганизмов - потенциальных возбудителей заболеваний, гидрофобность и способность к образованию биопленок.

Практическая значимость. Изучение культуральных свойств выделенных и идентифицированных штаммов, таких как способность к аэробному и анаэробному росту и скорость роста, позволили определить длительность фаз роста: лаг-фазы, экспоненциальной фазы, стационарной фазы, фазы отмирания, что необходимо для отработки биотехнологического процесса производства кефира.

Разработаны условия получения КЗ в стадии активного роста, что может служить рекомендацией при разработке биотехнологии производства кефиров на их основе.

С использованием современного высокопроизводительного секвенирования переменных участков генов 16S рРНК и ITS1-областей дрожжей проанализированы и сравнены микробиомы КЗ, отобранные из трёх различных регионов. Полученные данные помогут в стандартизации кефирных заквасок и продуктов функционального питания по целевому назначению и созданию стабильного консорциума КЗ.

Выделены чистые культуры МКБ и дрожжей из КЗ, изучена их адгезионная способность, приводящая к формированию биоплёнки, что повышает пробиотические характеристики этих культур, важные для создания новых препаратов.

Методология и методы исследования. Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте работы, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлены морфологические показатели КЗ, полученных из России, Осетии и Китая (район Тибета). С помощью электронно-микроскопических исследований установлено пространственное расположение микроорганизмов в структуре КЗ.

2. Высокопроизводительное секвенирование переменных участков генов 16S рРНК бактерий и ITS1-областей дрожжей КЗ позволило установить биологическое разнообразие ITS1-областей дрожжей КЗ позволило установить биологическое разнообразие молочнокислых бактерий и дрожжей, их населяющих. Показано, что основными представителями сложного сообщества КЗ являются молочнокислые бактерии, включающие лактобациллы, лактококки и лейконостоки в разных соотношениях. В образцах из Осетии были также обнаружены бактерии рода *Enterococcus*, в образцах из Тибета – уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, что определяет их отличительные свойства и биотехнологические характеристики.

3. Способность исследованных КЗ формировать биоплёнки и обладать гидрофобными поверхностями соответствует требованиям, предъявляемым к пробиотическим культурам.

4. Проведенные эксперименты показали, что искомые свойства могут в значительной степени варьировать от штамма к штамму даже внутри одного вида.

Поэтому для поиска и сравнения пробиотических свойств необходимо проверять все штаммы, выделяемые из КЗ.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы и результаты исследований представлены на международных и всероссийских конференциях: Всероссийской конференции с международным участием "Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии" (Москва, 2019); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов 2021" (Москва, 2021); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов 2022" (Москва, 2022). Восьмая научно-практическая Школа-конференция «Аллергология и клиническая иммунология», Сочи, Россия, 2-8 октября 2022; «International Conference Scientific research of the SCO countries synergy and integration» (КНР, Пекин, 9 марта, 2022); Научно-практическая конференция с международным участием "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции " (Москва, 6-7 апреля 2023).

Личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении экспериментальных исследований, представленных в работе, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке публикаций и научных докладов и написании диссертации.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, заключения, списка использованной литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 20 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 103 источников, в том числе 87 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, среди них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы научным руководителям — профессору доктору биологических наук Александру Ивановичу Нетрусову и ведущему научному сотруднику доктору биологических наук Лидии Григорьевне Стояновой.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре представлен анализ происхождения кефира и характеристики кефира; результаты исследований бактериального и дрожжевого состава КЗ; выявленные

основные трофические взаимоотношения между компонентами; данные по идентификации метаболических и структурных взаимодействия дрожжей и бактерий; данные по ферментации и хранению КЗ; биотехнологические основы приготовления кефира. Дан анализ использованных литературных данных, позволивших сформулировать цель собственных исследований.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Для проведения исследований использовали лиофилизированные культуры КЗ OS (Осетия), Т2-3 (Тибет), N5, N6 (Московский регион) из Коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. При идентификации выделенных лактобацилл и оценке их пробиотических показателей использовали для сравнения пробиотическую культуру *Lactobacillus rhamnosus* CM MSU 588 (из Коллекции микроорганизмов Московского государственного университета).

Лиофилизированные КЗ (0,1 г) помещали в 20 мл стерильного коровьего молока (жирность 1,5%) и культивировали в пробирках Фалькон на 50 мл при комнатной температуре (21°C) в течение месяца для оживления культур при постоянных пересевах.

Для определения морфологических свойств КЗ и выделенных чистых культур готовили фиксированные препараты (Практикум по микробиологии, 2005). Микроскопию проводили на микроскопе Микромед 1 (вар. 2-20) фирмы Микромед-1 с объективом 100x и окуляром 10x. Кефирные зерна культивировали путем последовательного пропускания общего количества зерен в увеличивающихся объемах молока для поддержания концентрации 10%. (ГОСТ 31454-2012). Биотехнологические показатели кефира определяли с помощью стандартных методов микробиологических и физико-химических исследований (ГОСТ 31454-2012).

Сканирующая электронная микроскопия кефирных зёрен. Для проведения сканирующей электронной микроскопии КЗ брали несколько зерен кефира, промывали их стерильной водой и помещали в 2,5% глутаровый альдегид на ночь для фиксации (4°C). Фиксированные образцы трижды промывали 0,1 М фосфатным буфером (15 мин), обрабатывали растворами увеличивающихся концентраций этанола – 30%, 50%, 70%, 90% и 96%, по 15 мин каждый раз, закрепляли 1% раствором OsO₄ при 4°C в течение 1 ч. Повторяли описанную выше операцию промывки буфером и растворами этанола - 70, 80, 90, 100%% (по 10 мин), причем абсолютным спиртом КЗ фиксировали три раза. Затем каждый образец дважды выдерживали в изоамилперацетате (15 мин) и, наконец, сушили. Высушенный образец прикрепляли к держателю двусторонней клейкой лентой и, после нанесения покрытия из золота, рассматривали в сканирующем электронном микроскопе (НИТАСНІ SU-8010) при увеличении в 10 000 раз.

Антимикробная активность. Антимикробную активность кефиров, приготовленных на основе КЗ из разных территориальных зон, определяли методом

диффузии в агар с измерением зоны подавления роста тест-культур (Егоров, 2004).

Для полного извлечения антибиотического комплекса из клеток проводили экстракцию ацетон-уксусной смесью АУВ (ацетон-уксусная кислота-вода) в соотношении 4:5:1. Уровень активности рассчитывали по стандартной кривой с учетом разведений стандартных антибиотиков, специфичных для каждой группы микробов (Стоянова, 2017).

Для выделения лактобактерий готовили анаэробный бульон MRS (HiMedia Laboratories, Индия). Для выделения микроорганизмов из биоты КЗ готовили молочный 2% агар. Для выделения чистых культур МКБ делали высев из накопительной культуры на плотную среду методом Коха и культивировали в аэробных и анаэробных условиях для выделения разных групп МКБ. Анаэробное культивирование проводили при комнатной температуре (21°C), на среде MRS. Для выделения лактобактерий, выросших в анаэробных условиях, готовили анаэробный бульон MRS, посеvy культивировали в анаэроостате с газ-пакетом (ООО «ГЕМ»; Россия) как описано ранее (Климко и др., 2019; Klimko et al., 2020). Дрожжи выделяли из КЗ на среде 5% сусло-агар (Fonseca et al., 2007).

Идентификация выделенных из КЗ дрожжей и бактерий была проведена с использованием секвенирования гена, кодирующего синтез 16S рРНК, с бактериальными праймерами и с праймерами на область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей.

Секвенирование и анализ последовательности. Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК с бактериальными праймерами.

ДНК из образцов была выделена с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) в соответствии с инструкцией производителя. Были использованы следующие праймеры: 515F (5' GTGBCAGCMGCCGCGGTAA 3'; Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC 3'; Merkel et al., 2019). Секвенирование проводили на приборе MiSeq system (Illumina, USA) с использованием набора реагентов, считывающих по 150 нуклеотидов с каждого конца. Демультимплексирование, последующая обработка и анализ полученных сиквенсов были проведены с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver. 2019.1 (Bolyen et al., 2019).

Высокопроизводительное секвенирование дрожжей по участку ITS1.

Область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК была амплифицирована из ДНК выделенных дрожжей с использованием набора праймеров для ПЦР ITS1F и ITS1R (Willger et al., 2014). После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) и подготавливали к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (Illumina, Inc.). После каналов UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дуплицированы (Edgar, 2013). Операционные таксономические единицы (OTUs) были объединены в группы с идентичностью последовательности $\geq 97\%$, из которых были удалены химеры. Таксономическая идентичность была установлена с использованием

BLASTn и справочной базы данных Fittings v. 1-2 (Dannemiller et al., 2014). Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью программы biom-format V1.3.1 (Caporaso et al., 2010).

Определение гидрофобности. Гидрофобность клеточной поверхности была определена в соответствии с методом микробной адгезии к углеводородам (MATH – microbial adhesion to hydrocarbons), как описано у Vinderola, Reinheimer (2003), с помощью гексадекана в качестве растворителя. Бактерии выращивали в бульоне MRS в течение 24 ч при 37°C. Важно оценить первоначальный рост, так как от него зависит степень разведения. Рост должен быть не менее 1,5 ед. о.п. в 3 мл MRS. Далее, выращенную культуру дважды отмывали в 60 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,5) при 4000 об/мин в течение 10 минут в специальных центрифужных стаканах на 20 мл или в пластмассовых пробирках с крышкой на 15 мл. Начальную оптическую плотность измеряли на ФЭКе при длине волны 560 нм (A₀) и доводили её до 0,9-1,1 единиц оптической плотности в 3 мл буфера. К полученным пробам добавляли 600 мкл гексадекана. Флакончики с резиновыми пробками интенсивно встряхивали в течение 2 минут и выдерживали в течение 1 часа при 37°C, чтобы произошло разделение фаз. Нижнюю водную фазу осторожно отбирали с помощью стерильного шприца и измеряли поглощение при 560 нм (A₁).

Гидрофобность клеточной поверхности по проценту (%) Г рассчитывали с использованием следующей формулы (Klimko et al., 2015):

$$\Gamma\% = \left(1 - \frac{A_0}{A_1}\right) \times 100\%$$

Определение способности к образованию биопленок. Бактериальные штаммы культивировали в жидкой питательной среде MRS при 37°C в течение 24 ч в химически чистых флаконах объёмом 12 мл с 20 химически чистыми тефлоновыми кубиками (3x3x3 мм). Затем бактериальную культуру аккуратно удаляли и 2 раза промывали блочки стерильной водой. Проводили фиксацию с помощью 96%-ного этанола (15 мин в 3 мл). После фиксации отмывали от спирта и удаляли излишки воды. Далее проводили окрашивание 1%-ным раствором кристаллического фиолетового (КФ, 3 мл) в течение 15 мин. Промывали 3 раза водой и экстрагировали краситель с кубиков с помощью 96%-ного этанола (30 мин). Измерения проводили на ФЭК при λ 590 нм против контроля без клеток микроорганизмов (Мартьянов и соавт., 2015).

Глава 3. Результаты и обсуждение

Морфологические характеристики кефирных зёрен

Кефирные зерна представляют собой компактные образования неправильной формы со складчатой или бугристой поверхностью, с упругой консистенцией, по форме и цвету напоминающие цветную капусту. Их размер варьирует от нескольких миллиметров до 2-4 см.

Кефирные зерна, полученные из частных домохозяйств в Осетии, Тибетском регионе Китая и Московском регионе, имели схожие морфологические характеристики: студенистые белые или слегка желтые массы с эластичной консистенцией размером от 1,2 до 2,5 см в диаметре (рис. 1).

Согласно данным электронной микроскопии, микробиота КЗ представлена дрожжевыми клетками лимоннообразной и вытянутой формы, которые находятся в тесном соседстве с кокками и короткими и длинными палочками. Видны (рис. 2) крупные (7-8 мкм) клетки дрожжей со шрамами от отделившихся почек и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1-3 мкм в длину).

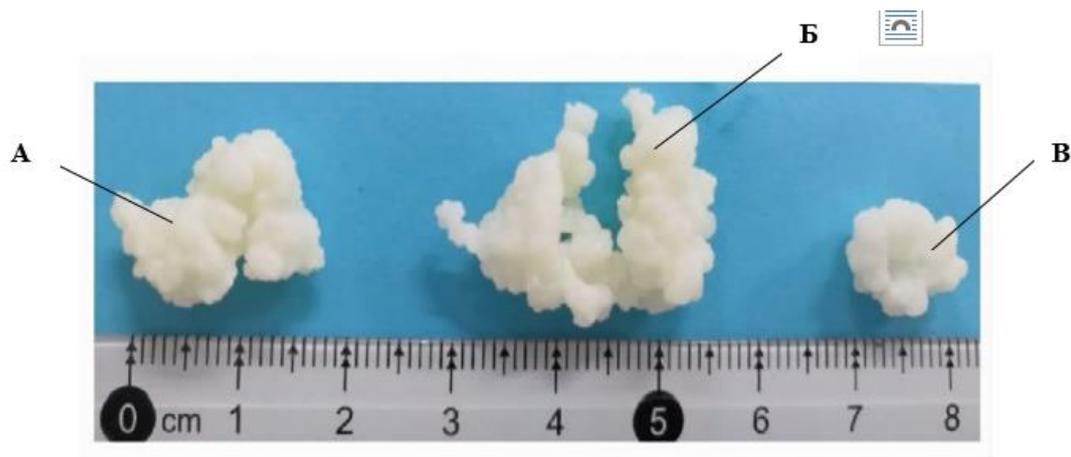


Рисунок 1. Вид кефирных зёрен из разных регионов: А - Осетии; Б - Тибета; В – Московского региона.

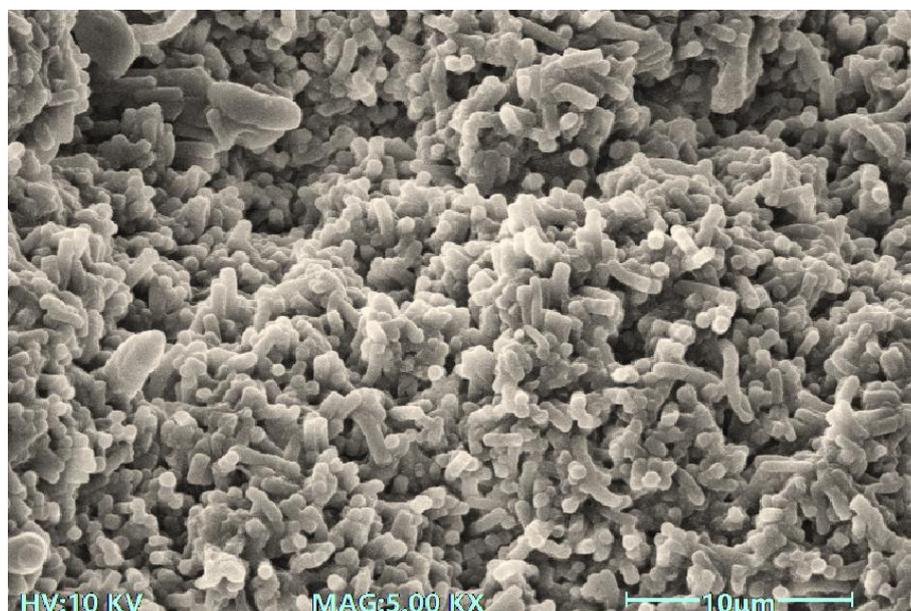


Рисунок 2. Вид кефирного зерна, выделенного из кефира (Тибет), в сканирующий электронный микроскоп (HITACHI SU-8010), увеличение 5 000 раз.

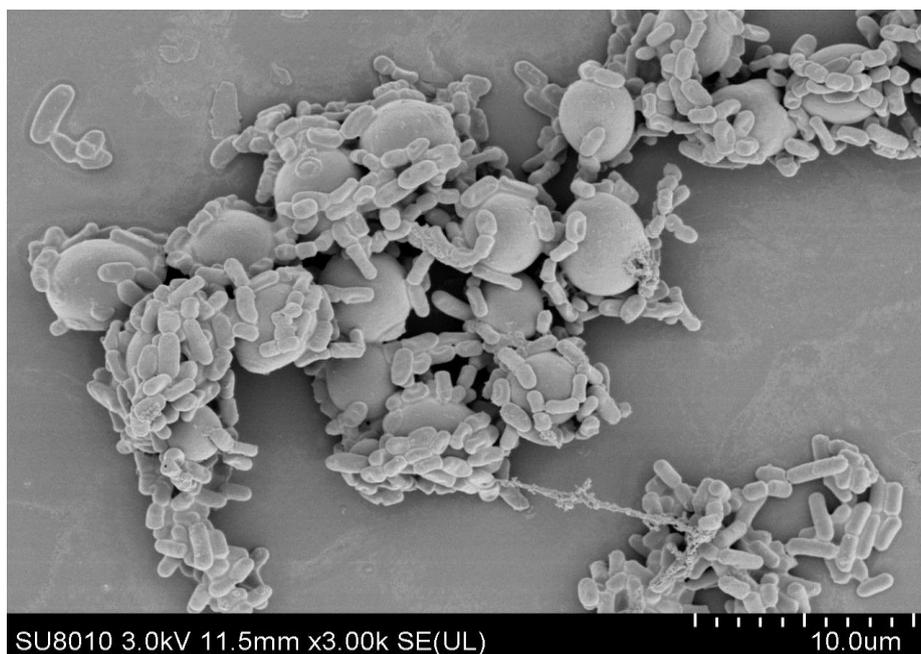


Рисунок 3. Вид поверхности кефирного зерна, выделенного из кефира (Тибет) в сканирующий электронный микроскоп (HITACHI SU-8010), увеличение 10 000 раз

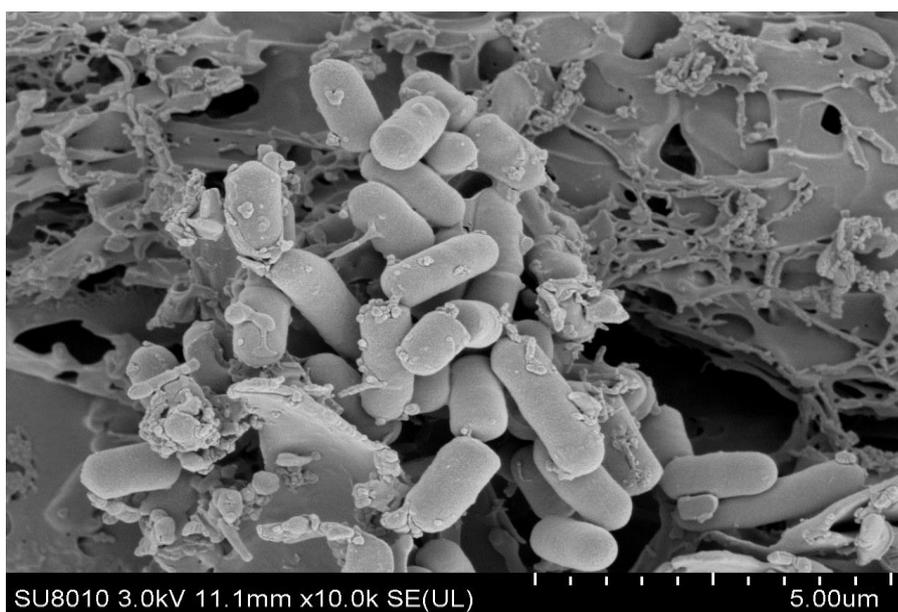


Рисунок 4. Вид середины кефирного зерна, выделенного из кефира (Тибет), в сканирующий электронный микроскоп (HITACHI SU-8010), увеличение 10 000 раз.

Микрофотографии показали четкое пространственное распределение микроорганизмов в зернах. Так, дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода (рис. 3), а в середине зерна обнаружены только бактерии, не нуждающиеся в кислороде для своей жизнедеятельности (рис. 4). Пространственная локализация дрожжей и бактерий в кефирных зернах подтверждает их различное отношение к молекулярному кислороду.

При этом дрожжи тяготеют к внешним слоям кефирных зёрен, тогда как молочнокислые бактерии стараются занимать внутренние их области, где концентрация кислорода в значительной степени снижена вследствие высокой дыхательной активности поверхностных дрожжей. Структура кефирных зерен из разных регионов была сходной.

Динамика роста кефирных зерен

Изначально для определения скорости роста кефирных зерен гравиметрическим методом были взяты фрагменты зерен OS, T2-3, N5, N6 приблизительно одинаковой массы (табл. 1). За время проведения эксперимента были получены числовые значения массы кефирных зерен и зависимость роста зерен от времени.

Наши результаты показали, что после 12 дней выращивания в молоке биомасса КЗ увеличилась на 61% (OS), 56% (T2-3), 65% (N5) и 64% (N6) по сравнению с исходным весом. То есть после 12 дней последовательной ферментации биомасса зерен увеличилась более чем на 60% по сравнению с начальной массой.

Кефир, полученный из КЗ из разных территориальных зон, соответствовал требованиям стандарта (ГОСТ 31454-2012) по органолептическим и физико-химическим показателям: молочно-белый цвет, консистенция однородная по всей глубине сгустка с небольшим газообразованием, вкус кисломолочный с незначительным запахом дрожжей; активная кислотность рН в пределах 3,4-4,2; общая титруемая кислотность, не превышающая 124°Т. Количество молочнокислых бактерий в кефирах, изготовленных на всех образцах КЗ, было не менее 10^7 КОЕ/г, а дрожжей - не менее 10^4 КОЕ/г.

Спектр антимикробного действия кефира на основе кефирных зёрен из разных территориальных зон

Важным критерием пробиотических продуктов является спектр их антимикробного действия. Изучение антимикробного спектра действия кефиров на основе КЗ из разных территориальных зон показало, что кефиры ингибируют разные группы бактерий: как грамположительные (на примере *Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli*). Максимальная ингибиторная активность против *S. aureus* и *E. coli* была зафиксирована у КЗ из Московского региона (образец N5) превысив активность КЗ из Тибета на 31,8% и 23,6%, соответственно (табл. 2).

Китайские исследователи (Miao et al., 2016) из тибетского кефира выделили бактериоцин пептидной природы, который проявлял антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка, что подтверждено и нашими данными. Фунгицидная активность является редким свойством МКБ, однако она была зафиксирована во всех образцах кефиров. При этом активность против аспергилла и дрожжей проявлялась больше в стационарной фазе (после 72 часов культивирования), была максимальной в образцах кефира, приготовленного из кефирных зерен Тибета.

Таблица 1.

Прирост биомассы кефирных зерен, отобранных из разных регионов, при пересевах в течение 12 суток

Шифр образцов, территориальный регион	Длительность инкубирования КЗ при пересевах, сут.				Прирост массы, %
	1	4	8	12	
	биомасса, г				12 сут
OS, Осетия	10,62±0,05	12,43±0,05	14,96±0,11	17,09±0,06	61,2±0,2
T2-3, Тибет	10,58±0,06	12,32±0,12	14,65±0,31	16,58±0,08	56,0±0,2
N5, Москва	10,65±0,035	12,58±0,1	15,28±0,1	17,58±0,11	65,3±0,2
N6, Москва	10,54±0,075	12,17±0,09	14,37±0,21	17,32±0,01	64,7±0,2

Таблица 2.

Антимикробный спектр действия кефиров, приготовленных на основе кефирных зерен из разных территориальных зон, в динамике культивирования.

Тест- культуры	Образцы	Время культивирования в обороте						Стандарт
		24 часа		48 часов		72 часа		
		д, мм	А	д, мм	А	д, мм	А	
<i>Staphylococcus aureus</i> 144	1	14	107	15	110	16	122	Nisaplin МЕ/мл
	2	13	105	16	122	17	145	
	3	12	98	13	105	15	110	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	14	32	18	54	20	62	Левомецетин ед/мл
	2	16	45	20	62	22	89	
	3	15	38	19	57	21	72	
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	1	12	52	13	58	15	108	Нистатин ед/мл
	2	14	80	16	126	17	138	
	3	15	108	15	108	16	126	
<i>Candida albicans</i> INA 00763	1	12	58	13	92	16	134	Нистатин ед/мл
	2	15	122	16	134	17	160	
	3	14	102	16	134	18	176	

Примечание: 1 – КЗ OS из Осетии; 2 - КЗ N5 из Москвы; 3 - КЗ T2-3 из Тибета; д, мм— диаметр зоны подавления роста тест-культуры; А— ингибиторная активность; МЕ/мл – активность по Nisaplin; ед/мл - активность по левомецетину и нистатину.

Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ разных регионов позволило выявить наиболее активные КЗ, производящие кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов, и самое главное – грибов (дрожжей) из рода *Candida*. Эти результаты могут быть положены основу профилактического и лечебного применения кефиров для лечения кандидозов человека.

Определение микробиома бактерий и дрожжей в кефирных зернах

Для эксперимента были выбраны кефирные зерна из коллекции зерен МГУ: OS, выделенные из заквасок Осетии, N5 из Москвы и T2-3 из Тибета. Анализ исследуемых кефирных зерен позволил сделать выводы о видовом составе дрожжей в исследованных образцах (рис. 5).

Высокопроизводительное секвенирование переменных участков генов 16S рРНК и области ITS1 КЗ позволило установить биологическое разнообразие МКБ и дрожжей, их населяющих. При этом КЗ из разных регионов показали различные составы дрожжевых и бактериальных видов, хотя по органолептическим показателям выработанные ими кефиры отличались незначительно. Так, в КЗ из Осетии и Тибета основные позиции в зерне занимают представители рода дрожжей *Kazachstania* (96 и 97%, соответственно), тогда как в КЗ московского региона представители этого рода составили лишь 55% от дрожжевой популяции, остальные 45% занимали дрожжи рода *Kluyveromyces*. Представители последнего рода занимают только 3% от популяции дрожжей в КЗ из Тибета, а в КЗ из Осетии их вообще не обнаружили. По-видимому, роль кляйверомицетов в таких КЗ выполняют представители рода *Pichia* из семейства *Pichiaceae* с содержанием 4% от всего дрожжевого населения КЗ из Осетии. Полученные данные четко дифференцируют КЗ из разных регионов по содержанию в них дрожжей разных родов, хотя принадлежат они одному семейству *Saccharomycetaceae* (за исключением семейства *Pichiaceae* в КЗ из Осетии). Это наблюдение может отражать эволюционирование КЗ от их предков, существующих тысячелетия, в КЗ московского региона наблюдается наибольшее видовое разнообразие дрожжей с преобладанием представителей рода *Kazachstania* (55%), однако от них лишь немного отстает род *Kluyveromyces* (45%). Эти два рода (с двумя видами каждый) монополизировали дрожжевой состав КЗ из московского региона. Следует также отметить выделение в чистую культуру дрожжей *Galactomyces candidus*, что является уникальным результатом данного исследования. До сих пор представителей этого рода не обнаруживали ни в одном КЗ в мире.

Видовое разнообразие бактерий в изученных КЗ (рис. 6) более представительное, чем было известно ранее, и наибольшее количество бактериальных родов обнаружено в КЗ из московского региона (5 родов). Причем представители лактобацилл и лактококков занимают первые места с общим доминированием в сообществе в 81%. Такие же примерно соотношения выявлены и в КЗ из Осетии (84% доминирования лактобацилл и лактококков) и Тибета (78% доминирования лактобацилл и лактококков). По-видимому,

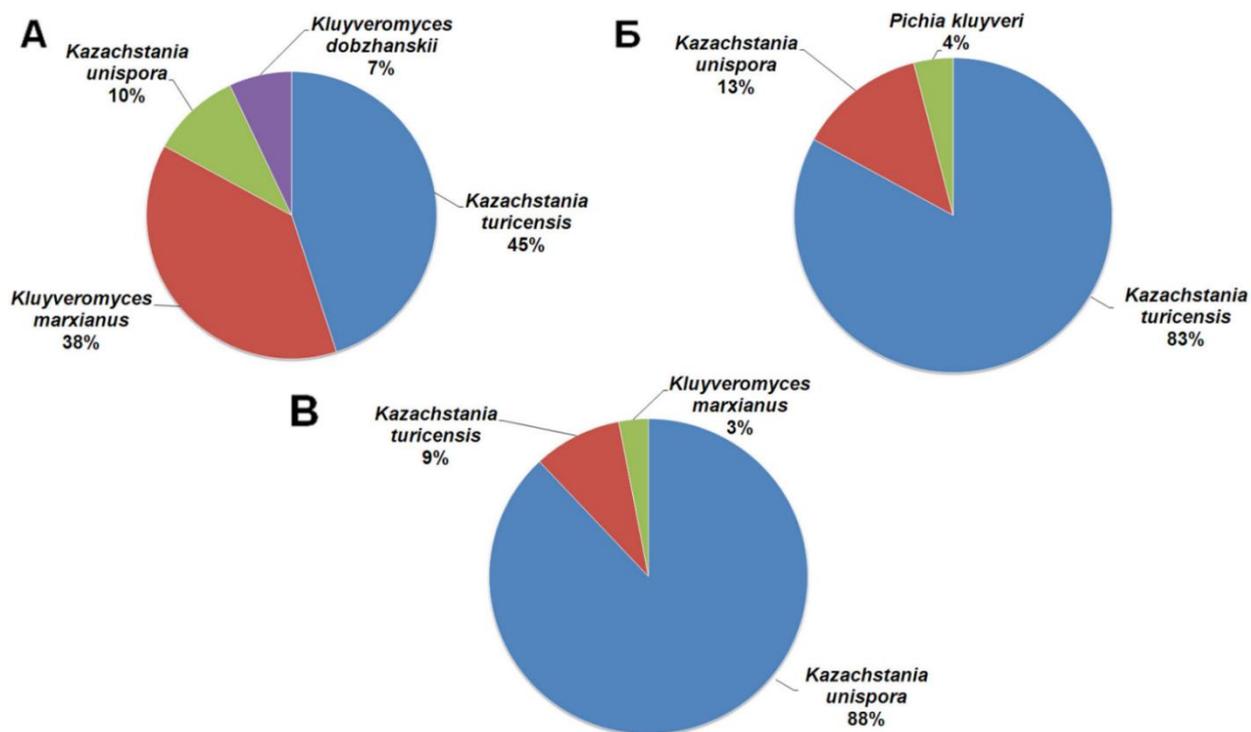


Рисунок 5. Дрожжевой состав микробиоты кефирных зерен из разных регионов, определенный методом секвенирования генов ITS1 (А - из Москвы; Б - из Осетии; В - из Тибета).

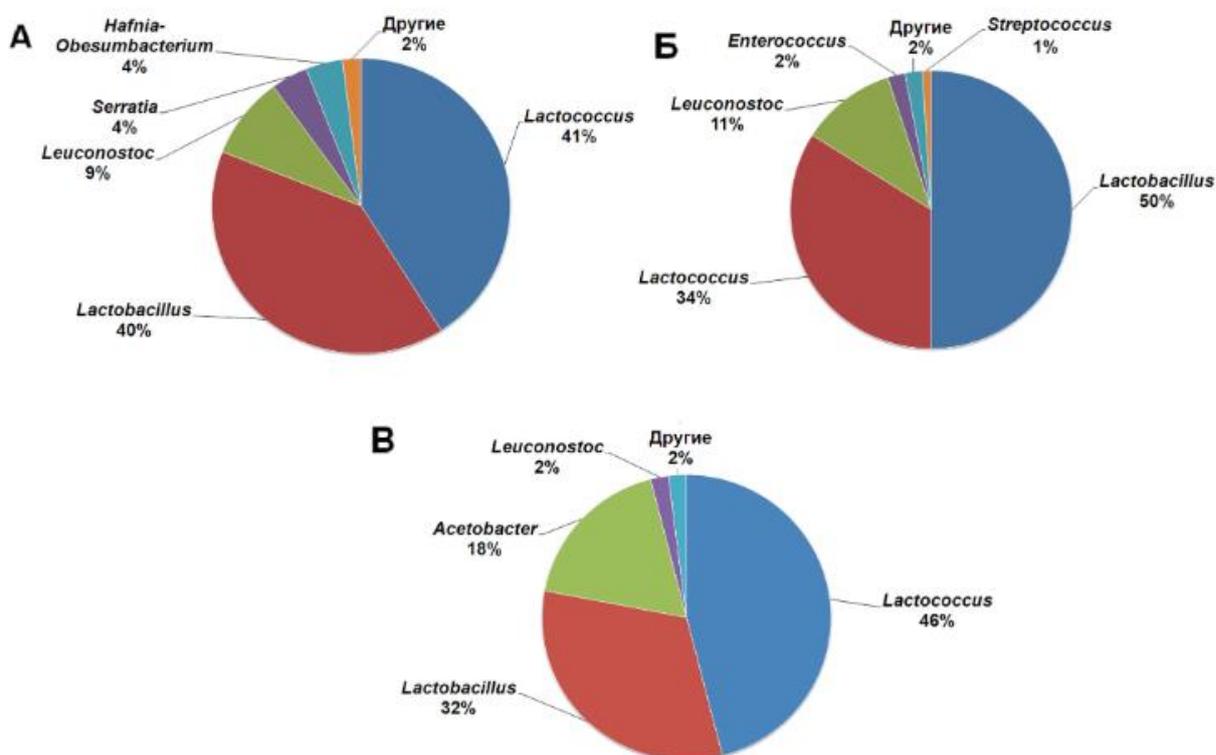


Рисунок 6. Бактериальный состав микробиоты кефирных зерен из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК (А - из Москвы; Б - из Осетии; В - из Тибета).

представители именно этих двух родов несут основную нагрузку по превращению лактозы в молочную кислоту при сбраживании молока КЗ. Лактобациллы и лактококки обнаружены практически во всех КЗ, изученных в разных странах мира. Обращает также внимание факт наличия представителей рода *Leuconostoc* во всех исследованных нами КЗ, хотя и в разных соотношениях: 9% в КЗ из московского региона, 11% - из Осетии и лишь 2% - из Тибета. Представители этого рода известны своими способностями образовывать мощные полисахаридные пленки в аэробных условиях и проводить гетероферментативное молочнокислородное брожение.

Выделение и идентификация чистых культур бактерий и дрожжей из кефирных зёрен

По результатам наших исследований (табл. 3) из изученных КЗ, полученных из разных регионов планеты, чаще всего выделяются бактерии *Lactobacillus kefir*, а также *Lactobacillus casei*, чаще всего выделяются дрожжи *Pichia fermentans* (штаммы N1, N5, N6, N7), а также *Yarrowia lipolytica* (вид аскомицетовых дрожжевых грибов), относящийся к порядку *Saccharomycetales*. Эти дрожжи были выделены из Тибетских КЗ, что подтверждено работами китайских ученых. Из образца кефирного зерна, полученного из Осетии, выделены дрожжи вида *Galactomyces candidus*, никогда ранее не встречавшиеся в описаниях, выделенных из КЗ дрожжевых культур. Этот вид растет при 37° С, что объясняет его выделение из образца КЗ, полученного из Осетии, характеризующейся жарким климатом.

Определение степени гидрофобности поверхностей выделенных культур МКБ

Гидрофобность клеток оценивали по относительному распределению между водной фазой и фазой органического растворителя гексадекана. По результатам экспериментов только штамм 2б, выделенный из КЗ кустарного производства в Москве (образец N5), продемонстрировал высокие показатели гидрофобности – 53,8%, опередив в этом отношении «эталонный» штамм 588 с 9,3% гидрофобности (рис. 7). Остальные исследованные культуры, в том числе штамм 4б, относящийся к тому же виду, что и штамм 2б, показали невысокое сродство к гексадекану, что свидетельствует об их более гидрофильных поверхностях. исследованные культуры, в том числе штамм 4б, относящийся к тому же виду, что и штамм 2б, показали невысокое сродство к гексадекану, что свидетельствует об их более гидрофильных поверхностях.

Определение способности выделенных культур МКБ к образованию биопленок

Степень пленкообразования соответствовала интенсивности окрашивания содержимого поверхности кубиков красителем. Пленкообразующими считали культуры, если значение ОП превышало контроль более чем в 3 раза ($0П580 > 1.0$), склонными к адгезии - в 2-3 раза ($0.6 > 0П600 < 1.0$), остальные оценивали, как не пленкообразующие.

Таблица 3.

Идентификация выделенных чистых культур бактерий и дрожжей из некоторых кефирных зёрен

Лабораторный шифр культуры	Результаты идентификации (род, вид)	Источник выделения (номер КЗ)
Бактерии		
16	<i>Lactobacillus kefir</i>	OS (Осетия)
26	<i>Lactobacillus kefir</i>	N5 (Москва)
36	<i>Lactobacillus casei</i>	T2 -3 (Тибет)
46	<i>Lactobacillus kefir</i>	N5 (Москва)
Дрожжи		
N1	<i>Pichia fermentans</i>	N1 (Москва)
N4	<i>Pichia fermentans</i>	N1 (Москва)
N5	<i>Pichia fermentans</i>	N5 (Москва)
N6	<i>Pichia fermentans</i>	N6 (Москва)
N7	<i>Pichia fermentans</i>	N7 (Москва)
T-2-3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	T 2-3 (Тибет)
OS	<i>Galactomyces candidus</i>	OS (Осетия)



Рисунок 7. Гидрофобность штаммов *Lactobacillus kefir*, выделенных из кефирных зёрен различного происхождения, в сравнении с *Lactocaseibacillus rhamnosus*.

Примечания: штаммы *L. kefir*, выделенные из образцов регионов: 16 - Осетия; 26, 46 - из г. Москвы (N5); 36 (*Lactobacillus casei*) - из Тибета, 588 - *Lactocaseibacillus rhamnosus*.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что наибольшую способность к образованию биопленок имеет культура 1б (среди бактерий, рис. 8). Наименьшие показатели отмечены для культур 2б и 4б, хотя культуры принадлежат одному виду, выделены из КЗ одного региона (г. Москва).

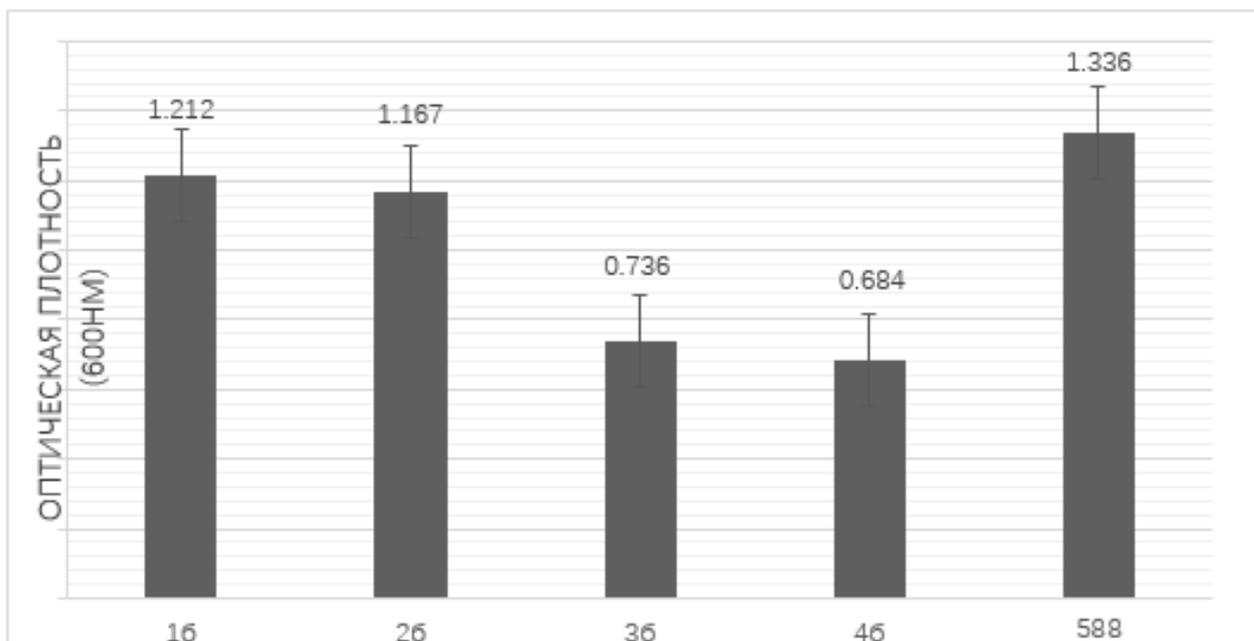


Рисунок 8. Способность выделенных штаммов *Lactobacillus kefir*, выделенных из КЗ разных территорий, к образованию биопленок в сравнении с *Lactocaseibacillus rhamnosus*. Примечания: штаммы *L. kefir*, выделенные из образцов регионов: 1б - Осетия; 2б, 4б - из г. Москвы (N5); 3б (*Lactobacillus casei*) - из Тибета.

Определение степени гидрофобности поверхностей выделенных культур дрожжей

Выделенные штаммы дрожжей показали разную степень гидрофобности клеточных поверхностей (рис. 9). Наиболее гидрофобную поверхность (до 54%) имеет штамм дрожжей OS (*Galactomyces candidus*), выделенный из КЗ Осетии.

Определение способности выделенных культур дрожжей к образованию биопленок

Для проверки способности к образованию биопленок были взяты чистые культуры дрожжей, выделенных из различных кефирных зёрен (рис. 10). Проведённые исследования показали, что дрожжи, относящиеся к виду *Pichia fermentans*, выделенные из КЗ московского региона (N5, N6), продемонстрировали различную способность к пленкообразованию. Самым активным в отношении образования биопленок оказался штамм *Yarrowia lipolytica*, выделенный из КЗ Тибета, он в 2-3 раза опережал штаммы

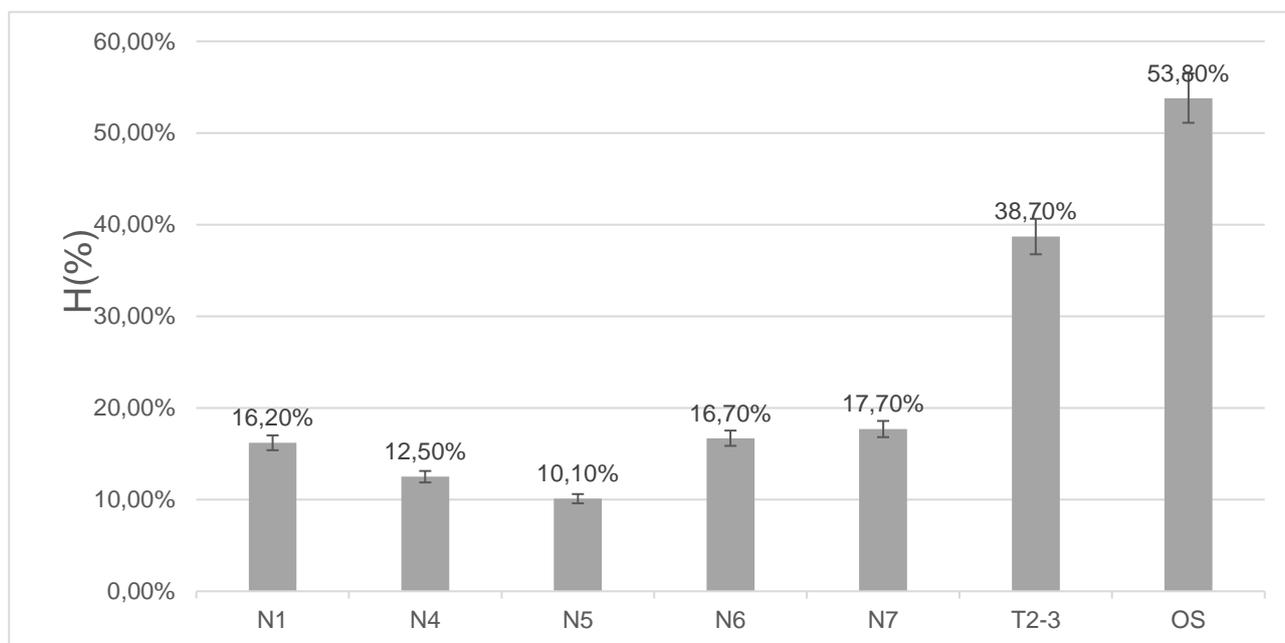


Рисунок 9. Гидрофобность выделенных из кефирных зерен дрожжей

Примечания: штаммы, выделенные из образцов: N1, 4, 5, 6, 7 - *Pichia fermentans* (из г. Москвы); T 2-3 - *Yarrowia lipolytica* (из Тибета); OS - *Galactomyces candidus* (из Осетии).

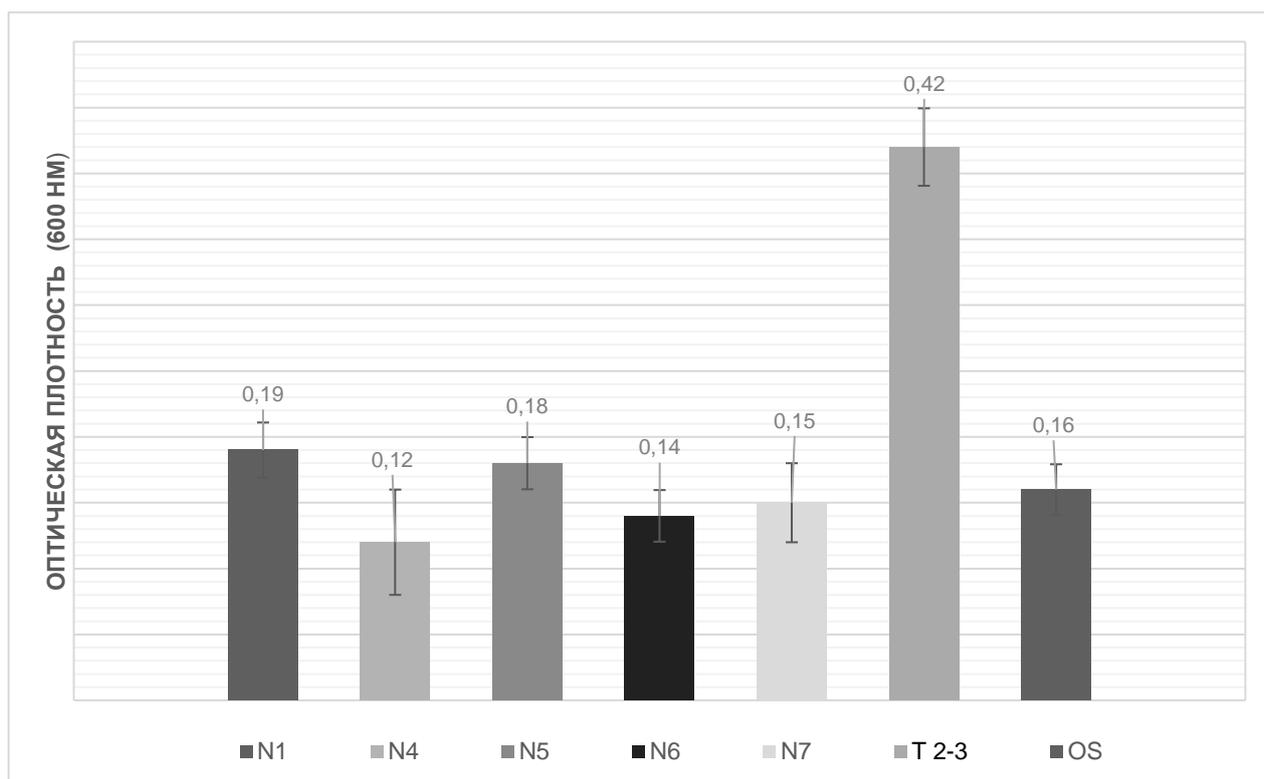


Рисунок 10. Сравнительная способность дрожжей к образованию биопленок на гидрофобных поверхностях типа тефлона, выделенных из КЗ разных регионов.

Примечания: штаммы, выделенные из образцов: N1, 4, 5-7 - *Pichia fermentans* (из г. Москвы); T2-3 - *Yarrowia lipolytica* - из Тибета; OS - *Galactomyces candidus* - из Осетии.

Pichia fermentans по этому показателю. При этом штамм *Galactomyces candidus* из КЗ Осетии, являясь «чемпионом» по гидрофобности поверхности, показал лишь среднюю способность к пленкообразованию, что говорит о том, что нет прямой корреляции между образованием биопленки и степенью гидрофобности поверхности микробных клеток. Известно, что адгезия является необходимым условием для реализации важных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов в кишечнике человека и животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы явилось изучение микробных сообществ кефирных зёрен, выделенных из разных территориальных зон их исторического происхождения. В ходе работы были изучены морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства кефирных зёрен, полученных из России, Осетии и Китая, район Тибета. Электронно-микроскопические исследования КЗ, показали четкое пространственное распределение микроорганизмов в зернах. Так, дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода, а в середине зерна обнаружены только бактерии, не нуждающиеся в кислороде для своей жизнедеятельности. Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ разных регионов, позволило выявить наиболее активные КЗ, производящие кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов, и самое главное – грибов (дрожжей) из рода *Candida*. Это достижение позволит заложить основы профилактического и лечебного применения кефиров для лечения кандидозов человека.

Проведённые исследования показали определенное филогенетическое разнообразие микроорганизмов, составляющих микробиом КЗ, отобранных для исследований из разных регионов планеты. С использованием метода высокопроизводительного секвенирования маркерных генов микробиома КЗ показано, что основными представителями сложного сообщества кефирных зёрен являются молочнокислые бактерии (лактобациллы и лактококки в разных соотношениях), а также *Leuconostoc* spp. При сравнении дрожжевого состава установлено, что у всех КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania turicensis* независимо от места их происхождения. Но КЗ из Тибета и Москвы содержат также и *Kluyveromyces marxianus*, которые обладают пробиотическими свойствами.

Проведённые исследования показали, что дрожжи, относящиеся к одному виду *Pichia fermentans*, выделенные из КЗ московского региона (N5, N6), продемонстрировали различную способность к пленкообразованию, при этом самым активным в отношении образования биопленок был штамм *Yarrowia lipolytica*, выделенный из КЗ Тибета, он в 2-3 раза опережал штаммы *Pichia fermentans* по этому показателю. Штамм *Galactomyces*

candidus из КЗ Осетии, с наиболее гидрофобной поверхностью из выделенных в чистую культуру дрожжей, показал лишь среднюю способность к пленкообразованию, что еще раз продемонстрировало отсутствие прямой корреляции между степенью гидрофобности поверхности микробных клеток и их способностями образовывать биопленки. При этом адгезия является необходимым условием для реализации важных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов в кишечнике человека и животных. В ассоциированном со слизистой оболочкой кишечника состоянии у микробов с высокой адгезивной способностью имеются явные преимущества при их нахождении в ЖКТ.

При сравнении биотехнологических свойств, изученных КЗ разных регионов установлено, что все они имеют различные свойства и могут быть использованы в производствах кефира (табл. 4).

Таблица 4.

Сравнения исследованных штаммов по основным характеристикам

Свойство	КЗ №5 (Москва)	КЗ Т2-3 (Тибет)	КЗ OS (Осетия)
Прирост биомассы, % /12 сут.	64,7±0,2	56,0±0,2	61,2±0,2
Подавление роста <i>Staphylococcus aureus</i> (A)	175	110	122
Подавление роста <i>Escherichia coli</i> (A)	89	105	62
Подавление роста <i>Aspergillus</i> (A)	138	126	108
Подавление роста <i>Candida</i> (A)	134	160	176
Гидрофобность (бактериальный состав)	++	++	+++
Образование биопленки (бактериальный состав)	++	+	++
Гидрофобность (дрожжевой состав)	++	++	+++
Образование биопленки (дрожжевой состав)	++	++	+++
Рейтинг	1-2	3	1-2

Из данных таблицы 4 видно, что КЗ N5, полученные из Москвы, по приросту биомассы, подавлению роста *Staphylococcus aureus* и грибов рода *Aspergillus* опережают остальные изученные КЗ, а OS выделенные из Осетии лучше других подавляют рост дрожжей *Candida* spp., имеют бактерии и дрожжи с высокой гидрофобностью и способностью к образованию биопленок, поэтому для дальнейших разработок можно рекомендовать КЗ N5 и OS.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании морфологии зёрен OS, T2-3 и N5 с помощью электронно-микроскопических исследований установлено, что факультативные анаэробы (дрожжи) расположены ближе к поверхности зерна, а в середине его - анаэробные лактобациллы.

2. Определены биотехнологические показатели кефирных зерен (КЗ) разных территориальных зон: в лабораторных условиях: биомасса зерен OS, T2-3 и N5 после 12 суток роста в коровьем молоке увеличилась на 56 - 65 %.

3. Путем высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК бактерий и ITS1-областей дрожжей КЗ установлено, что в их состав входят молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, а в зернах T2-3 выявлены также *Acetobacter* spp. Представителями дрожжевого сообщества КЗ чаще всего являются дрожжи родов *Kazachstania* или *Kluveromyces*, при этом из КЗ T2-3 выделены дрожжи *Yarrowia lipolytica*, а из OS – *Galactomyces candidus*, последние – впервые из КЗ.

4. Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ OS, T2-3 и N5, показало, что наиболее активными относительно оппортунистических патогенов являются зерна N5 (Москва); они же обладают наиболее высокой скоростью роста.

5. Максимальной ингибиторной активностью по отношению к дрожжам рода *Candida* обладает кефир на основе зёрен OS (Осетия), что может быть в дальнейшем использовано для лечения и профилактики кандидозов человека. Дрожжи и бактерии из этих же КЗ обладали наилучшими адгезионными свойствами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI:

1. Дин Ф., Красильникова А.А., Леонтьева М.Р., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты с применением высокопроизводительного секвенирования // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2022. Т. 77. № 4. С. 266–272. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-266-272 IF (РИНЦ) - 0,630. [Ding F., Krasilnikova A.A., Leontieva M.R., Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2022. V. 77. № 4. P. 286-291. DOI: 10.3103/S0096392522040010. IF (SJR) - 0.189]. Вклад автора в печатных листах: (0.38/0.22) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Дин Ф., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Микробиом и метабиотические свойства кефирных зёрен и кефиров на их основе // Микробиология. 2022. Т. 91. № 4. С. 391-409. doi: 10.31857/S0026365622100214. IF (РИНЦ) - 1,550. [Ding F., Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Microbiome and metabiotic properties of kefir grains and kefirs based on them // Microbiology. V. 91, № 4, с. 339-355. DOI:10.1134/S0026261722100885. IF (WoS): 0.26; IF (SJR) - 0.341]. (1.19/0.62)

3. Дин Ф., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал // Антибиотики и химиотерапия. Т. 67. №. 7-8. С. 4-7. DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7. IF (РИНЦ) - 0,528. (0.30/0.16)

4. Дин Ф., Красильникова А.А., Нетрусов А.И., Стоянова Л.Г. Первичная идентификация микробиома кефирных зерен из разных территориальных зон // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2022. Т. 42. № 2. С. 160-169. DOI: 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202202003. IF (РИНЦ) - 0,577. (0.63/0.34)