

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 579.22:579.676

**Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты
с применением высокопроизводительного секвенирования****Ф. Дин^{1, 2} , А.А. Красильникова¹ , М.Р. Леонтьева¹ ,
Л.Г. Стоянова¹ , А.И. Нетрусов^{1, 3, *} **¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Shenzhen MSU-BIT University, No 299, Ruyi Road, Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518172, China;³Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, ул. Мясницкая, д. 20, Москва, 101000, Россия

*e-mail: anetrusov@mail.ru

Исследовали таксономический состав и пространственную локализацию дрожжей и бактерий в кефирных зернах (КЗ), полученных для изучения из разных регионов планеты. Показано разнообразие их микробиома с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей. Установлено, что основными представителями сложного сообщества КЗ из разных регионов являются молочнокислые бактерии (лактобациллы, лактококки и *Leuconostoc* spp. в разных соотношениях) и разные виды дрожжей рода *Kazachstania* (сем. Saccharomycetaceae). В КЗ из Тибета выявлены уксуснокислые бактерии и незначительный процент дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, а в КЗ из Осетии — дрожжи *Pichia kluyveri*.

Ключевые слова: дрожжи, кефирные зерна, лактобактерии, микробиом, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-266-272

В последние годы большое внимание уделяется созданию и введению в рацион человека полезных продуктов с пробиотическими микроорганизмами для организации функционального питания. Одним из самых популярных молочных продуктов, с неоспоримой пользой от употребления, является кефир, который можно приготовить из различных видов молока, таких как коровье, козье, буйволиное, овечье или верблюжье, путем микробного сбраживания (заквашивание молока кефирными зернами, КЗ) [1, 2]. Кефир — традиционный напиток, считающийся «функциональной пищей» благодаря своим питательным и оздоровительным свойствам. Его производят путем сбраживания лактозы молока видами микроорганизмов, присутствующими в КЗ [1]. Кефирные зерна содержат пробиотические микроорганизмы, которые существуют в сложной матрице из белков и полисахаридов [3, 4]. Существует симбиотическая связь между микроорганизмами, присутствующими в КЗ, в которой бактерии и дрожжи выживают и делятся своими биопродуктами как источниками энергии и микробными факторами роста. Этот консорциум микроорганизмов отвечает за гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение и спиртовое брожение [5, 6]. Молочнокислые бактерии (МКБ) являются основной популяцией в КЗ с небольшим содержанием

дрожжей, погруженных в полисахаридные слои кефирана, который представляет собой гетерополисахарид, состоящий из равных пропорций глюкозы и галактозы, образуемый *Lactobacillus kefirifaciens* [4, 7]. Более 23 различных видов дрожжей были выделены из КЗ и из полученных с их помощью напитков различного происхождения, при этом преобладающими видами явились различные виды дрожжей, являющиеся пробиотическими культурами [6, 8, 9]. При сбраживании молока КЗ образуются многие функциональные соединения, такие как биоактивные пептиды (например, с антигипертензивной, антиоксидантной, противоаллергенной, противоопухолевой, противовоспалительной и снижающей холестерин активности) [10], антимикробные соединения (например, органические кислоты, спирты, диоксид углерода и бактериоцины) и гетерополисахариды (например, кефиран) с потенциальной пробиотической активностью [11]. Исследования показывают, что пробиотические бактерии в кишечнике регулярных потребителей кефира более многочисленны, что коррелирует с улучшением здоровья [1–3, 12]. В связи с этим растет интерес к использованию кефира и применению его как важного компонента функционального питания.

Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как высоко-

производительные технологии секвенирования, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного сообщества КЗ. Во многих лабораториях мира постоянно ведут исследования по дальнейшему изучению свойств КЗ и кефирана для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств. Необходимо создание устойчивых пробиотических микробных сообществ из выделенных и изученных культур КЗ, выявление и устранение возможного антагонизма между выбранными культурами.

Целью настоящей работы было изучение микробиома КЗ, выделенных из разных территориальных зон, для создания устойчивых микробных сообществ и эффективных пробиотических продуктов, полезных для здоровья.

Материалы и методы

Для проведения исследований получали КЗ из частных хозяйств разных регионов традиционного его применения, включая Кавказ (Северная Осетия), Тибетскую область Китая и Московскую область (таблица). Все зерна хранили в лиофильном состоянии в коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Таблица

Образцы КЗ, взятые для исследований

Регион выделения КЗ	Шифр культуры
Москва	N5
Северная Осетия	OS
Тибет	T2-3

Выращивание КЗ. Лиофилизированные КЗ активировали в стерильном 1,5%-ном молоке с регулярными пересевами (2 раза в нед.) при комнатной температуре (21–22°C). При пересевах КЗ отмывали на стерильных ситах стерильным физиологическим раствором от накопившихся полисахаридов. Зерна в молоке хранили при 4°C.

Микроскопия КЗ. Для установления пространственного расположения микроорганизмов в КЗ проводили сканирующую электронную микроскопию препаратов зерен, выделенных из различных зон: ближе к поверхности и в центре [6]. Частицы КЗ, промытые стерильной водой, фиксировали в течение 30 мин в 2,5%-ном глutarовом альдегиде на фосфатном буфере (1,8 мМ KH_2PO_4 ; 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 137 мМ NaCl ; 2,7 мМ KCl) и затем обезвожены в серии спиртов возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) и далее в смесях абсолютного спирта и ацетона (3:1, 1:3, 1:3). Далее образцы помещали в абсолютный ацетон и проводили высушивание гидратированного материала методом «критической точки» (ВКТ) в HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Япония). Высушенные препараты

прикрепляли на специальные столики двусторонней клейкой лентой и напыляли смесью Au–Pd в ионно-распылительной установке (Eiko IB-3 Ion Coater, Hitachi, Япония). Изучение образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония) в центре коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ имени М.В. Ломоносова (уникальная научная установка «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»), и с помощью сканирующего электронного микроскопа SU-8010 (Hitachi, Япония) в МГУ-ППИ в Шэньчжэне.

Высокопроизводительное секвенирование микробиома КЗ. ДНК из образцов была выделена с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкцией производителя. Коллекции ампликонов *фрагментов генов* 16S рРНК были получены методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами к участку V4 по ранее описанной методике [13]. Были использованы следующие праймеры: 515F: 5' GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3' [14], Pro-mod-805R: 5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3' [15]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq System (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002, Illumina, США) 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 [16]. Таблица операционных таксономических единиц (OTU) была составлена в программе SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

Область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК была амплифицирована из ДНК КЗ с использованием набора праймеров для полимеразной цепной реакции BITS (5'-ACCTGCGGARGGATCA-3') и B58S3 (5'-GAGATCCRTTGYTRAAAGTT-3') для области ITS1 [17]. После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., США) и готовили к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (Illumina, Inc., США). С помощью системы UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дуплицированы [18].

OTUs были объединены в группы с идентичностью последовательности $\geq 97\%$, из которых были удалены химеры с использованием SILVAngs pipeline (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) для участка V4 гена 16S rRNA и knomics/biota pipeline (<https://biota.knomics.ru>) для области ITS1 ДНК дрожжей.

Таксономическая идентичность была присвоена с использованием BLASTn и справочной базы

данных Fittings v. 1-2 [19]. Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью формата файлов BIOM (версия V1.3.1 [20]).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были проведены в трех независимых биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием Excel (Microsoft Office, США). Значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

КЗ можно описать как студенистые белые или слегка желтоватые массы эластичной консистенции, размером от 0,3 до 3,5 см в диаметре, похожие на маленькие головки (кочанчики) цветной капусты, погруженные в матрикс экзополисахаридов (рис. 1, А и Б).

Пространственная локализация дрожжей и бактерий в КЗ. Изученные КЗ продемонстрировали тесную пространственную связь бактерий и дрожжей на поверхности зерен (рис. 1Г). Во внутренних частях КЗ обнаружили практически полное отсутствие клеток дрожжей (рис. 1В), видны только клетки МКБ (1–4 мкм в длину). На внешней стороне КЗ видны крупные (7–8 мкм) клетки дрожжей со шрамами от отделившихся почек (рис. 1Г) и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1–3 мкм в длину).

Это отражает метаболические потребности бактерий и дрожжей, их отношение к молекулярному кислороду. Так, дрожжи, являясь аэробными организмами, приспособливают свое местоположение в зерне ближе к поверхности (рис. 1Г), тогда как МКБ, являясь аэротолерантными анаэробами, располагаются как на поверхности, тесно прилекая к клеткам дрожжей, так и занимают весь внутренний объем зерна. Такое тесное прилегание бактерий к клеткам дрожжей наводит на мысль о химических связях этих микроорганизмов и облигатной зависимости МКБ от дрожжей, которые снабжают клетки бактерий биологически активными веществами, ростовыми компонентами и витаминами. Тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и дрожжей, стимулирующих рост МКБ, были отмечены многими исследователями [3–6, 21–24].

Клетки же дрожжей, особенно те, которые не способны метаболизировать лактозу молока, облигатно зависят от МКБ, активно расщепляющих лактозу молока на глюкозу и галактозу. Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями в КЗ до конца не изучены. Однако когда бактерии отделены от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно [2].

Определение родового состава бактериальных культур в КЗ. Исследования, начатые в 1980-х гг., показали, что филогенетическое сравнение видов

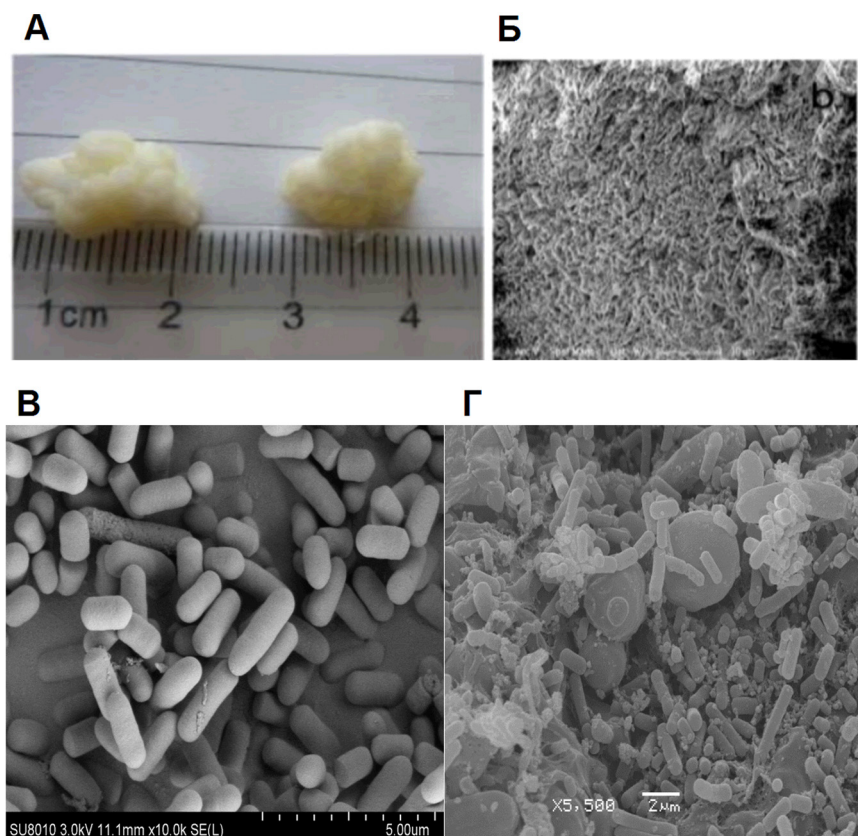


Рис. 1. Микрофотографии КЗ из Тибета (Т2-3). А — внешний вид; Б — поверхность кефирного зерна в сканирующем электронном микроскопе (Hitachi SU-8010; увеличение $\times 5000$); В — внутренняя часть кефирного зерна (увеличение $\times 40000$); Г — внешняя поверхность кефирного зерна (увеличение $\times 40000$).

микроорганизмов с использованием консервативной области генома является более точным и стабильным для выявления их сходства или различия. Таким образом, использование сравнения последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, вошло в повседневную практику при установлении филогенетических отношений. Ген 16S рРНК состоит из множества вариабельных и консервативных областей, поэтому с целью таксономического сравнения были разработаны универсальные праймеры для всего гена 16S рРНК, который включает и консервативные, и вариабельные области, причем гипервариабельные области с соответствующими праймерами чаще используют для таксономического сравнения. Высокопроизводительное секвенирование вариабельных областей генов, кодирующих синтез бактериальных 16S рРНК в микробиоме зерен, проводили с целью выявления родового бактериального разнообразия образцов из Осетии (OS), образца N5 из г. Москвы и T2-3 из Тибета.

При сравнении КЗ из разных географически расположенных зон установлено, что основными бактериальными представителями их состава являются *Lactobacillus* и *Lactococcus* (рис. 2). По результатам секвенирования можно видеть, что в наших исследуемых КЗ лактобациллы и лактококки присутствуют практически в равных отношениях в образце из московского региона (40 и 41%), с не-

большим преобладанием лактобацилл в образцах из Осетии (50% к 34%), а в КЗ из Тибета больше выявлено лактококков (46%), чем лактобацилл (32%). Во всех образцах в небольших количествах были обнаружены гетероферментативные МКБ *Leuconostoc* spp.: 11% – в осетинском образце, 9% – в образце из Москвы и лишь 2% – в тибетском образце. Лейконостоки определяют аромат кефира, поскольку, являясь гетероферментативными МКБ, образуют молочную и уксусную кислоту, углекислый газ, этиловый спирт, эфиры, ароматические вещества ацетон и диацетил, а также декстран, способствующий образованию матрицы КЗ [21, 22].

В микробиоме КЗ присутствуют и другие бактерии в незначительных количествах. В образце из Тибета нашли представителей рода *Acetobacter* (18%), что согласуется с экспериментальными данными китайских ученых [21]. Бактерии из семейства *Acetobacteriaceae* класса альфа-протеобактерий окисляют этанол до уксусной кислоты, а ацетат и лактат – до CO_2 и H_2O , и создают матрицу бактериальной целлюлозы в КЗ.

Рибосомальный кластер эукариот имеет в своем составе два внутренних транскрибируемых спейсера – ITS1 и ITS2, которые разделяют в рибосомной ДНК гены 18S, 5.8S и 28S РНК. Данные последовательности представляют собой объединение ядерных генов, которые располагаются

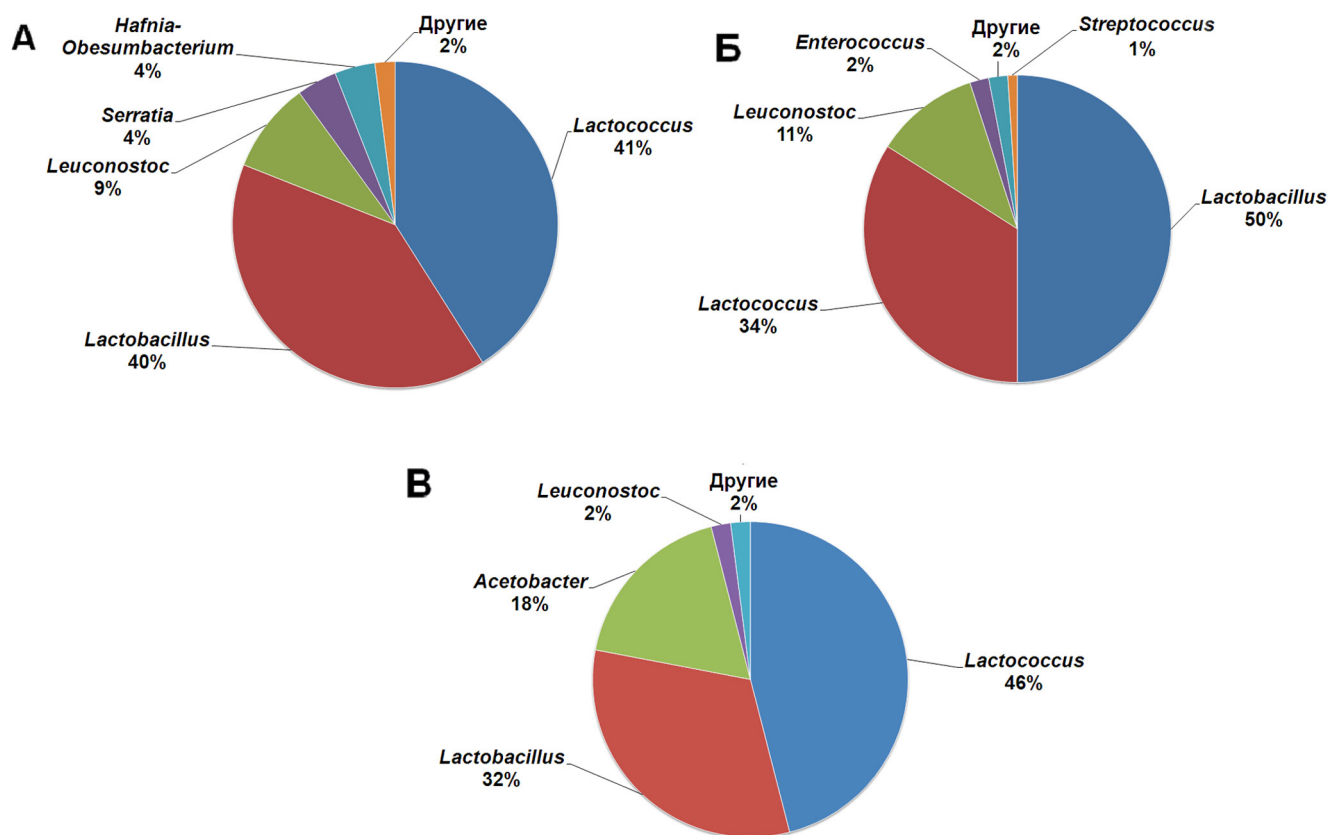


Рис. 2. Бактериальный состав микробиоты КЗ из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК. Образцы: А – из Москвы (N5); Б – из Осетии (OS); В – из Тибета (T2-3)

в виде tandemных повторов и при этом последовательности ITS1 и ITS2 содержат участки рибосомальных генов.

Как видно из рис. 3, в микробиоте всех образцов КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania turicensis*, независимо от региона их выделения. Это – бывший вид *Saccharomyces* sp., часто выделяемый из разных КЗ и упоминавшийся в работах китайских ученых [21, 22]. Но в образцах КЗ из Тибета и Москвы обнаружены еще и дрожжи *Kluyveromyces marxianus*, которые выявлены и в кефире из Аргентины. Эти дрожжи составляют большинство или всю популяцию дрожжей, использующих лактозу, и обладают пробиотическими свойствами [8]. Невысокое в процентном соотношении (0,12%) присутствие дрожжей класса *Saccharomycetes*, *Pichia kluyveri*, обнаружено в образцах из Осетии. Эти дрожжи относятся к филуму *Ascomycota*, размножаются почкованием, отличаются быстрым ростом (достигают зрелости через 72 ч) и часто встречаются в КЗ из Китая или Испании [21, 22, 24]. Совместное сосуществование разных видов дрожжей и бактерий свидетельствует об их симбиотических, взаимовыгодных взаимоотношениях.

Проведенные исследования показали определенное филогенетическое разнообразие составляющих микробиом КЗ микроорганизмов, отобранных для исследований из разных регионов их исторического происхождения. С использованием метода высокопроизводительного секвенирова-

ния микробиома КЗ показано, что основными представителями сложного сообщества КЗ являются МКБ (лактобациллы и лактококки в разных соотношениях, а также *Leuconostoc* spp.), и разные виды дрожжей родов *Kazachstania* и *Kluyveromyces* в КЗ из различных регионов. Установлены и отличия в составе их микробиомов, причем МКБ родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* составляли около 80% от всех прочтений с бактериальными праймерами, а МКБ рода *Leuconostoc* – от 2 до 11%, что должно существенным образом влиять на вкус и текстуру конечного напитка. Обнаруженное значительное количество бактерий семейства *Acetobacteriaceae* в КЗ из Тибета (18% от всех бактериальных прочтений) свидетельствует о неминуемом появлении уксусного привкуса и запаха в конечном продукте, который в таком виде может не понравиться потребителю, особенно в детском возрасте.

В отношении дрожжей различия еще нагляднее: так, в дрожжах из Тибета и Осетии выявлено почти полное доминирование представителей рода *Kazachstania* (96% и 94% от всех прочтений соответственно), однако видовое соотношение – прямо противоположное. В КЗ из Осетии преобладает вид *K. turicensis* (81% прочтений), тогда как в тибетских КЗ – *K. unispора* (87% прочтений), что явно свидетельствует о разнообразии КЗ разных регионов и возможном влиянии дрожжевого и бактериального разнообразия на качество кефиров, из них вырабатываемых. Влияние установ-

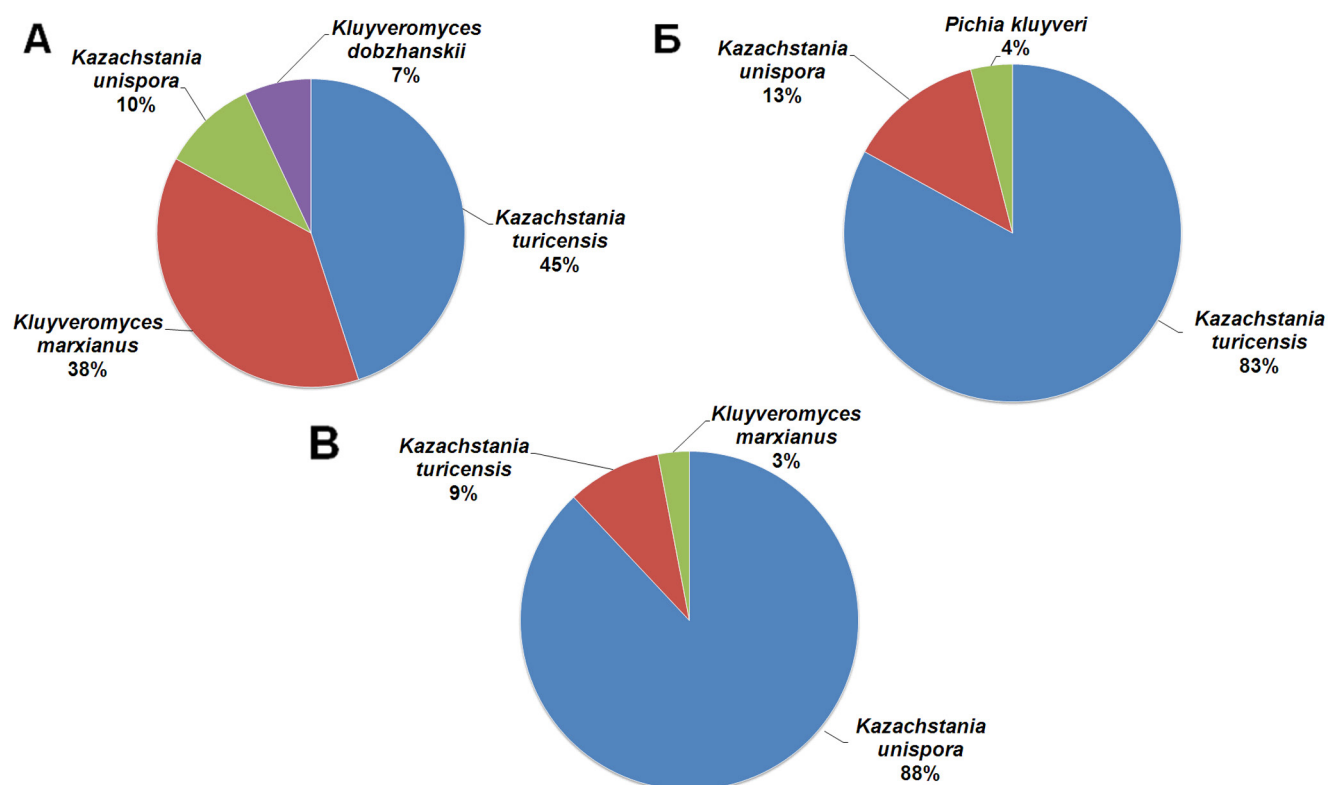


Рис. 3. Разнообразие дрожжей в составе КЗ из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования. Образцы: А — из Москвы (N5); Б — из Осетии (OS); Б — из Тибета (T2-3)

ленного микробного разнообразия КЗ на потребительские свойства кефирных напитков предстоит еще изучать с привлечением специалистов — нутриционистов и дегустаторов.

Пространственная локализация дрожжей и бактерий в КЗ подтверждает их различное отношение к молекулярному кислороду. При этом дрожжи тяготеют к внешним слоям КЗ, тогда как МКБ стараются занимать внутренние их области, где концентрация кислорода в значительной степени снижена вследствие высокой дыхательной активности поверхностных дрожжей.

Полученные экспериментальные данные после выделения чистых культур дрожжей и бактерий из КЗ могут быть использованы для создания

устойчивых пробиотических микробных сообществ и продуктов функционального питания, необходимых в период пандемии коронавирусной инфекции.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке правительства провинции Шэньчжэнь, Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь и в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety // *Nutrients*. 2020. Vol. 12. N 2. P. 346–359.
2. Nejati F., Junne S., Neubauer P. A big world in small grain: a review of natural milk Kefir starters // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8. N 2: 192.
3. Khokhlacheva A.A., Egorova M.A., Kalinina A.N., Gradova N.B. Trophic patterns of functioning and microbial profile of an evolutionarily established associative culture of kefir grains // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. N 4. P. 466–447.
4. Radhouani H., Goncalves C., Maia F.R., Oliveira J.M., Reis R.L. Biological performance of a promising kefir-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018. Vol. 29. N 8: 124.
5. Kotova I.B., Cherdynseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process // *Advances in microbiology, infectious diseases and public health*, vol. 932 / Ed. G. Donelli. Cham: Springer, 2016. P. 93–102.
6. Wang S.Y., Chen K.N., Lo Y.M., Chiang M.L., Chen H.C., Liu J.R., Chen M.J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain // *Food Microbiol.* 2012. Vol. 3. N 2. P. 274–285.
7. Zajšek K., Kolar M., Goršek A. Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains // *Int. J. Dairy Technol.* 2011. Vol. 6. N 4. P. 544–548.
8. Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 30. N 1. P. 43–53.
9. Zanirati D.F., Abatemarco M., Cicco Sandesb S.H., Nicolai J.R., Nunes A.C., Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures // *Anaerobe*. 2015. Vol. 3. N 2. P. 70–76.
10. Amorim F.G., Coitinho L.B., Dias A.T., Friques A.G.F., Monteiro B.L., de Rezende L.C.D., Pereira T.D.M.C., Campagnaro B.P., De Pauw E., Vasquez E.C., Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteo-peptidomics: bioprospection of antihypertensive molecules // *Food Chem.* 2019. Vol. 28. N 2. P. 109–119.
11. Cotârleț M., Vasile A.M., Cantaragiu A.M., Gaspar-Pintilieșcu A., Crăciunescu O., Oancea A., Moraru A., Moraru I., Bahrim G.E. Colostrum-derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts // *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati Fascicle VI: Food Technol.* 2019. Vol. 4. N 3. P. 54–68.
12. Ahmed Z., Wang Y., Ahmad A., Khan S. T., Nisa M., Ahmad H. Kefir and health: a contemporary perspective // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. Vol. 5. N 3. P. 422–434.
13. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. Vol. 24. N 2. P. 16–25.
14. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Vol. 80. N 16. P. 5116–5123.
15. Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology*. 2019. Vol. 13. N 6. P. 671–680.
16. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nat. Biotechnol.* 2019. Vol. 37. N 8. P. 852–857.
17. Bokulich N.A., Mills D.A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79. N 8. P. 2519–2526.
18. Willger S.D., Grim S.L., Dolben E.L., Shipunova A., Hampton T.H., Morrison H.G., Filkins L.M., O'Toole G.A., Moulton L.A., Ashare A., Sogin M.L., Hogan D.A. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis // *Microbiome*. 2014. Vol. 2. N 1: 40.
19. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nat. Methods*. 2013. Vol. 10. N 10. P. 996–998.
20. Dannemiller K.C., Reeves D., Bibby K., Yamamoto N., Peccia J. Fungal high-throughput taxonomic identifi-

cation tool for use with next-generation sequencing (FHiT-INGS) // J. Basic Microbiol. 2014. Vol. 5. N 4. P. 315–321.

21. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QI-ME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. Vol. 7. N 5. P. 335–336.

22. Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // Food Microbiol. 2009. Vol. 26. N 8. P. 770–775.

23. Gao J., Gu F., Abdella N. H., Ruan H., He G. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China // J. Food Sci. 2012. Vol. 77. N 8. P. 425–433.

24. Zheng Y., Lu Y., Wang J., Yang L., Pan C., Huang Y. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains // PLoS One. 2013. Vol. 8: e69868.

25. Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elgueabala N., Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities // Rev. Iberoam. Micol. 2006. Vol. 23. N 1. P. 67–74.

Поступила в редакцию 14.05.2022

После доработки 23.08.2022

Принята в печать 10.11.2022

SHORT COMMUNICATION

Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing

F. Ding^{1,2} , A.A. Krasilnikova¹ , M.R. Leontieva¹ ,
L.G. Stoyanova¹ , A.I. Netrusov^{1,3,*} 

¹Microbiology Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Shenzhen MSU-BIT University, No 299, Ruyi Road, Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518172, China;

³Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, 20 Mjasnitskaja str., Moscow, 101000, Russia

*e-mail: anetrusov@mail.ru

The taxonomic composition and spatial localization of yeast and bacteria in kefir grains (KG) obtained for study from different regions of the planet were investigated. The diversity of their microbiome has been demonstrated by high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA genes and the ITS1 region of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S complex of yeast rRNA. It has been established that the main representatives of the complex community of KG from different regions are lactic acid bacteria (LAB; lactobacilli, lactococci and *Leuconostoc* spp. in different ratios), and different types of yeast of the genus *Kazachstania* (family Saccharomycetaceae). Acetic acid bacteria and a small percentage of yeast *Kluyveromyces marxianus* were detected in the KG from Tibet, and yeast *Pichia kluyveri* was detected in the KG from Ossetia.

Keywords: yeasts, kefir grains, lactobacilli, microbiome, high-performance sequencing

Funding: The research was carried out with financial support of Shenzhen province Government and MSU-BIT joint University in Shenzhen (PRC), and as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 23-1-21 (registered no. 121032300094-7).

Сведения об авторах

Дин Фань — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: dingfan0110@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9614-3388>

Красильникова Анна Александровна — студентка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-42-23; e-mail: akzayka@gmail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5968-764X>

Леонтьева Мария Романовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-45-45; e-mail: x_blade@inbox.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7150-9010>

Стоянова Лидия Григорьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-45-45; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1192-2863>

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83; e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>