

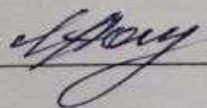
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ И
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ГЕМОЛИЗИНОВ У ШТАММОВ
ГАММА-ПРОТЕОБАКТЕРИЙ

Обучающийся 4 курса
группы 01-903
"14" июня 2023 г.



Панасенко М. Д.

Научный руководитель
д-р биол. наук, доцент
"14" июня 2023 г.



Марданова А.М.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор
"14" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Бактерии семейства <i>Morganellaceae</i> и их роль в патогенезе	7
1.1.1 Общая характеристика бактерий семейства <i>Morganellaceae</i>	7
1.1.2 <i>Morganellaceae</i> как возбудители инфекций человека	8
1.2 Инфекции мочевыводящих путей	10
1.2.1 Классификация и распространенность ИМП	10
1.2.2 Характеристика основных возбудителей ИМП	12
1.2.3 Характеристика уропатогенных <i>E. coli</i>	13
1.3 Роль <i>Morganella</i> и <i>Providencia</i> в патогенезе ИМП	16
1.3.1 Бактерии семейства <i>Morganellaceae</i> как возбудители ИМП	16
1.3.2 Факторы вирулентности <i>Morganella</i> и <i>Providencia</i>	17
1.3.3. Антибиотикорезистентность <i>Morganella</i> и <i>Providencia</i>	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Описание штаммов, условия культивирования	23
2.2 Определение гемолитической активности	23
2.3 Исследование адгезивных свойств бактерий	24
2.4 Влияние мочевины на рост <i>M. morganii</i> и <i>P. rettgeri</i> МР	24
2.5 Определение уреазной активности	25
2.6 Идентификация генов гемолизинов	26
2.6.1 Выделение геномной ДНК	26
2.6.2 ПЦР-амплификация	26
2.6.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле	28
2.7 Биоинформатический анализ генов гемолизинов	29
2.8 Статистическая обработка результатов	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30

3.1 Характеристика гемолитической активности штаммов <i>M. morganii</i> 59 и <i>P. rettgeri</i> MP	30
3.1.1 Анализ динамики роста штаммов на среде LB	30
3.1.2 Исследование гемолитической активности микроорганизмов	30
3.2 Характеристика адгезивных свойств бактерий	33
3.3 Характеристика уреазной активности и влияния мочевины на рост и гемолитическую активность штаммов <i>M. morganii</i> 59 и <i>P. rettgeri</i> MP	35
3.3.1 Определение уреазной активности бактерий	35
3.3.2 Исследование влияния мочевины на рост микроорганизмов	35
3.3.3 Влияние мочевины на гемолитические свойства культур	37
3.4 Идентификация генов гемолизинов в геномах исследуемых штаммов	39
3.5 Биоинформатический поиск генов гемолизинов в геноме <i>P. rettgeri</i>	40
ВЫВОДЫ	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) считаются одними из наиболее распространенных заболеваний в мире и характеризуются обширной этиологией, различной продолжительностью и симптоматикой. На вероятность развития инфекции влияют различные факторы, однако наибольший эффект оказывает возраст [Islam *et al.*, 2022; Paul, 2018]. В патогенезе ИМП принимает участие множество микроорганизмов, особая роль в сообществе отводится представителям условно-патогенной микрофлоры. Именно они в условиях сниженного иммунитета человека активно распространяются, занимают новые ниши и вызывают значительные поражения. Это обусловлено наличием видоспецифичных факторов вирулентности [Learman *et al.*, 2019].

Morganella morganii и *Providencia rettgeri* – грамотрицательные оппортунистические, неспорообразующие подвижные палочки обитающие преимущественно в мочевыводящих путях, встречающиеся также в ранах, ротовой полости и дыхательных путях [Liu *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2017]. Относятся к трибе *Proteaceae* и семейству *Morganellaceae*, что подтверждено полногеномным анализом [Chen *et al.*, 2012], и обладают значительной приспособленностью к неблагоприятным факторам среды за счет проявляемой гемолитической и уреазной активности [Olaitan *et al.*, 2014], а также гидролиза мочевины и формирования биопленок [Sharma *et al.*, 2017]. Помимо участия в развитии ИМП, штаммы этих видов способны проникать в кровотоки и приводить к развитию обширного сепсиса и бактериемии с массивным гемолизом [Kim *et al.*, 2007].

Широкая распространенность антибиотиков наряду с их неконтролируемым применением и приобретенной резистентностью, обусловленной горизонтальным переносом генов и мутациями, повышает устойчивость микроорганизмов и все чаще приводит к бессимптомному протеканию инфекций, множественным рецидивам, сопровождающихся высокой вероятностью летальных исходов. Данные условия привели к

возникновению штаммов с широкой и чрезвычайно широкой лекарственной устойчивостью [Liu *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2022]. Не смотря на активный поиск новых технологий создания и производства антимикробных веществ, проблема эффективного лечения и преодоления антибиотикорезистентности по-прежнему актуальна и требует комплексного подхода.

Целью данной работы является оценка гемолитических и адгезивных свойств штаммов *Morganella morganii* 59 и *Providencia rettgeri* МР.

Решались следующие задачи:

- 1) Оценка гемолитических свойств штаммов *M. morganii* 59 и *P. rettgeri* МР.
- 2) Характеристика адгезивных свойств штаммов.
- 3) Оценка уреазной активности и изучение влияния мочевины на рост и гемолитическую активность штаммов.
- 4) Идентификация с помощью ПЦР-амплификации генов гемолизинов HrmA и HlyA в геномах *M. morganii* 59 и *P. rettgeri* МР.
- 5) Биоинформатический поиск в геноме *Providencia rettgeri* генов гемолизинов.

ВЫВОДЫ

- 1) Исследуемые штаммы проявляют гемолитическую активность в разной степени: *M. morganii* 59 проявляет выраженную активность в начале экспоненциальной фазы и характеризуется высокой продуктивностью на 2 и 3 часы роста, а *P. rettgeri* МР свойственна гемолитическая активность в стационарной фазе роста.
- 2) Штамм *M. morganii* 59 способен к агглютинации дрожжей в отсутствии и присутствии маннозы, что свидетельствует о наличии у него фимбрий I и III типов. *P. rettgeri* МР агглютинирует дрожжевые клетки только в отсутствии маннозы, что свидетельствует о наличии у бактерий фимбрий I типа. Оба штамма способны эффективно адгезировать к абиотической поверхности.
- 3) *M. morganii* 59 и *P. rettgeri* обладают уреазной активностью. 0.5-2% мочевины ингибируют рост и продуктивность *M. morganii* 59 по гемолитической активности. В случае *P. rettgeri* МР мочевина, напротив, повышает продуктивность бактерий по гемолитической активности в стационарной фазе роста.
- 4) Методом ПЦР-анализа с использованием праймеров, сконструированных к *hpmA* и *hlyA* генам *M. morganii* 190, установлено наличие генов α -гемолизина и кальций-независимого гемолизина в геноме штамма *M. morganii* 59 и их отсутствие в геноме *P. rettgeri* МР.
- 5) Биоинформатический поиск с помощью BLAST-анализа позволил идентифицировать в геноме *P. rettgeri* PROV002 три оперона, кодирующие гипотетические гомологи кальций-независимого гемолизина *M. morganii* 190. Гемолитические свойства штамма *P. rettgeri* МР могут быть обусловлены активностью кальций-независимого гемолизина.