

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: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ДЕТЕКЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ГЕНОВ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ РОДА
*LACTOBACILLUS***

Студент 4 курса

Группа 01-505

« 31 » 05 2019 г.

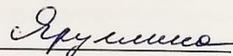


(Г.Р. Каримуллина)

Научный руководитель

к.б.н., доцент

« 31 » 05 2019 г.



(Д.Р. Яруллина)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

« 31 » 05 2019 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань - 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Общая характеристика бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	7
1.2 Антибиотикорезистентность бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	10
1.3 Горизонтальный транспорт генетических детерминант AP	13
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	18
2.1 Объекты исследования и условия культивирования	18
2.2 Видовая идентификация лактобацилл	19
2.3 Определение чувствительности бактерий к антибиотикам	20
2.4 Выделение ДНК из бактерий	22
2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	23
2.6 Электрофорез и секвенирование ДНК	24
2.7 Оценка транспорта генов между бактериями методом «Filter mating»	26
2.8 Компьютерная обработка данных	26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1 Характеристика исследуемых штаммов лактобацилл	27
3.2 Характеристика фенотипической чувствительности лактобацилл к	

антибиотикам	30
3.3 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности	
лактобацилл	37
3.4 Мобильность генов устойчивости к тетрациклину у лактобацилл	43
ВЫВОДЫ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы рода *Lactobacillus* широко распространены в природе, а некоторые виды являются важнейшими представителями микробиоты организма человека [Бондаренко, Грачева, 2003]. Они применяются в качестве стартерных культур в пищевой отрасли и как пробиотики в медицине.

Доказана эффективность лактобацилл в лечении и профилактике кишечных инфекций и антибиотикоассоциированных синдромов [Sazawal *et al.*, 2006]. Лактобациллы обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов и иммуномодулирующим действием в организме, усиливают пищеварительную и моторную функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Благоприятные эффекты лактобацилл нормальной микрофлоры кишечника на здоровье человека обусловили их широкое использование в пробиотиках.

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при употреблении в достаточных количествах оказывают положительное влияние на макроорганизм [Яруллина, Фахруллин, 2014]. Важнейшим требованием к штаммам, входящим в состав пробиотиков, является антибиотикорезистентность (АР) - только устойчивые к антибактериальным препаратам (АБП) бактерии можно совмещать с антимикробной терапией при лечении кишечных инфекций. В то же время, включение устойчивых к антимикробным препаратам штаммов лактобацилл в состав пробиотиков и пищевых продуктов представляет потенциальную угрозу распространения генов устойчивости к антибиотикам по пищевой цепи и среди микробиоты с помощью конъюгативных плазмид и транспозонов [Mathur, Singh, 2005; Jacobsen *et al.*, 2007; Ammor *et al.*, 2008; Nawaz *et al.*, 2011]. В связи с этим у бактерий, используемых в пробиотиках, недопустимо наличие «мобильных» генов устойчивости к антимикробным агентам и приобретенной АР [EFSA, 2008; Mauryhofer *et al.*, 2008].

Цель работы – анализ мобильности генов устойчивости к эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу у лактобацилл.

В соответствии с поставленной целью решаются следующие задачи:

1) Из коммерческих пробиотических препаратов выделить бактерии рода *Lactobacillus* и установить их таксономический статус с помощью MALDI Biotyper;

2) Охарактеризовать фенотипическую устойчивость исследуемых лактобацилл к эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу диско-диффузионным методом и по значению минимальной подавляющей концентрации (МПК);

3) Определить генетические детерминанты устойчивости лактобацилл к эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);

4) Оценить возможность горизонтального транспорта генов антибиотикорезистентности лактобацилл методом конъюгации на мембране («filter mating method»).

ВЫВОДЫ

1) Из пяти коммерческих пробиотических препаратов («РиоФлора Баланс Нео», «Ацилакт», «Линекс», «Эвиталия», «Аципол») выделены 16 штаммов лактобацилл и с помощью MALDI Biotyper установлена их принадлежность к видам *Lactobacillus plantarum* (9 штаммов), *L. helveticus* (4 штамма) и *L. paracasei* (3 штамма).

2) Диско-диффузионным методом установлено, что 15 кишечных изолятов лактобацилл и 16 штаммов пробиотических лактобацилл чувствительны к эритромицину и хлорамфениколу.

3) Устойчивость кишечных и пробиотических лактобацилл к тетрациклину была исследована диско-диффузионным методом и с помощью определения МПК тетрациклина, в результате чего 12 штаммов отнесены к устойчивым.

4) С помощью ПЦР установлено, что выделенные из закваски «Эвиталия» лактобациллы *L. paracasei* E-1 несут ген *tet(K)*, а три кишечных изолята *L. fermentum* – гены *tet(K)* и *tet(M)* в плазмидной ДНК.

5) У кишечных и пробиотических лактобацилл часто встречались гены устойчивости к ципрофлоксацину *gyr(A)* и *par(C)*, но отсутствовали гены *ermB*, *cat* и *int*.

6) В эксперименте «filter mating» лактобациллы, несущие гены устойчивости к тетрациклину, не передавали их грамположительным (*Staphylococcus epidermidis*) и грамотрицательным (*Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*) бактериям в процессе конъюгации.

