

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 (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

1.1. Общая характеристика молочнокислых бактерий	7
1.2. Пробιοтический потенциал молочнокислых бактерий	10
1.3. Антибиотическая способность молочнокислых бактерий в отношении к условно-патогенным микроорганизмам	12
1.4. Патогенность	13

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ГИДРОГЕЛИ АЛЬГИНАТА  
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1. Объекты исследования	19
2.2. Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов в касторе	19

Обучающийся 2 курса  
группы 01-040-2

А.Г. Сабанаева

Научный руководитель  
канд. биол. наук, доцент

П.В. Зеленихин

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор

О.Н. Ильинская

2.9. Статистическая обработка результатов	26
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1. Микробиологическое анализ культур МКБ	27

Казань-2022

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Общая характеристика молочнокислых бактерий.....	7
1.2 Пробиотический потенциал молочнокислых бактерий .....	10
1.3 Антагонистическая способность молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.....	12
1.4 Вагинальный кандидоз .....	13
1.5 Применение полисахаридов для иммобилизации пробиотических микроорганизмов .....	16
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	19
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	19
2.1 Объекты исследования .....	19
2.2 Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов и клеток .....	19
2.3 Определение оптической плотности культур молочнокислых бактерий и концентрации клеток в среде .....	21
2.4 Определение антагонистической активности штаммов молочнокислых бактерий по отношению к клиническим изолятам <i>Candida</i> .....	22
2.6 МТТ – тест .....	23
2.7 Проточная цитофлуориметрия.....	24
2.8 Методика приготовления альгинатных капсул.....	26
2.9 Статистическая обработка результатов .....	26
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	27
3.1 Микробиологический анализ культур МКБ.....	27



3.2	Определение взаимозависимости параметров оптической плотности культур МКБ и концентрации клеток молочнокислых бактерий на разных стадиях роста.....	28
3.3	Характеристика антагонистической активности молочнокислых бактерий по отношению к клиническим изолятам <i>Candida</i> .....	31
3.4	Определение изменения жизнеспособности молочнокислых бактерий в присутствии компонентов гидрогелевых систем иммобилизации на основе альгината.....	33
3.5	Оценка изменения жизнеспособности линии опухолевых клеток в присутствии гидрогеля альгината в МТТ-тесте .....	34
3.6	Характеристика способности молочнокислых бактерий иммобилизованных в гидрогеле альгината индуцировать апоптоз опухолевых клеток .....	36
	<b>ВЫВОДЫ</b> .....	38
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	41

ДОСС – док-туберкулин

КОС – колониобразовательная единица

МКБ – молочнокислые бактерии

МТТ – 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил) – 2,5-диметилтетразолия бромид

## ВВЕДЕНИЕ

Вагинальный кандидоз является широко распространённой грибковой инфекцией среди женщин репродуктивного возраста. Его клинические проявления доставляют множество неудобств в повседневной жизни, а также могут являться причиной возникновения воспалительных процессов органов малого таза, присоединения вторичной инфекции и увеличивают риск осложнений во время беременности [Пестрикова с соавт., 2021]. Схемой лечения вагинального кандидоза является назначение противогрибковых препаратов в сочетании с пробиотиками для восстановления нормальной микрофлоры влагалища. Многие исследования показывают, что молочнокислые бактерии (МКБ) обладают антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способны подавлять их рост и развитие [Liang *et al.*, 2016].

МКБ играют важную роль в формировании нормального микробиома, они обладают свойствами адгезии к слизистой оболочке кишечника, временной колонизации желудочно-кишечного тракта человека, поддерживают здоровую микрофлору влагалища и продуцируют органические кислоты, обладающие бактериостатическим и бактерицидным действием [Sevda, 2019]. Они также способны к стимуляции иммунной системы, снижению уровня холестерина в сыворотке крови и снижению риска развития злокачественных новообразований. Также было выявлено, что некоторые МКБ обладают антиоксидантной активностью и способствуют продлению срока жизни [Kivanc, Sevda, 2020].

Большинство МКБ используются в качестве пробиотиков и согласно определению Всемирной гастроэнтерологической организации под термином «пробиотики» подразумеваются живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на состояние здоровья хозяина [Hill *et al.*, 2014]. Именно поэтому проводится множество исследований по выделению и идентификации новых штаммов



МКБ с потенциальной пробиотической активностью. Благодаря данному свойству возрос интерес к производству инкапсулированных пробиотических продуктов, а также лекарственных средств.

Для создания систем доставки лекарств и веществ направленного действия все чаще используются полисахариды природного происхождения [Манаенков с соавт., 2010]. В основном их применяют в виде различных сфер и капсул, на основе полисахаридных гидрогелей. Они потенциально являются хорошими носителями различных веществ, обеспечивающих постоянный и длительный эффект.

Целью данной работы является характеристика биологической активности МКБ иммобилизованных в гидрогель альгината

В соответствии с поставленной целью решаются следующие задачи:

- 1) Определить взаимосвязь параметров оптической плотности и жизнеспособности *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* 8 P-A3, *Lactobacillus fermentum* 3-2 и *Streptococcus lactis* на разных стадиях роста.
- 2) Оценить антагонистическую активность штаммов МКБ по отношению к клиническим изолятам *Candida*.
- 3) Охарактеризовать изменения жизнеспособности МКБ в присутствии компонентов гидрогелевых систем иммобилизации на основе альгината.
- 4) Оценить изменения жизнеспособности линии опухолевых клеток NuTu-80 в присутствии гидрогеля альгината в МТТ-тесте.
- 5) Охарактеризовать способность МКБ, иммобилизованных в гидрогеле альгината, индуцировать апоптоз клеток кишечника в модельной системе с использованием клеток аденокарциномы NuTu-80.

## ВЫВОДЫ

1) Параметры оптической плотности и концентрации клеток культур *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Streptococcus lactis* находятся в сложной взаимосвязи и непропорционально изменяются в ходе культивирования.

2) Охарактеризована антагонистическая активность *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* 8 P-A3, *Lactobacillus fermentum* 3-2, *Streptococcus lactis* по отношению к 6 клиническим изолятам *Candida sp.* Наивысшие антагонистические свойства *Streptococcus lactis* и *Lactobacillus fermentum* 3-2, угнетавшие рост 100% и 83.3% исследованных изолятов, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* проявляли антагонистические свойства в отношении 4 из 6 исследованных изолятов, *Lactobacillus plantarum* 8 P-A3 антагонистические свойства в отношении 3 из 6 изолятов *Candida*, а *Lactobacillus acidophilus* – лишь одного.

3) Клетки штаммов *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* не сохраняли жизнеспособности после инкубации в течение 24 ч в 50 мМ TRIS HCl буфере, pH 7.4, выживаемость *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 составила 54 %. Наибольшей выживаемостью в условиях обработки обладали *Streptococcus lactis* и *Lactobacillus fermentum* 3-2, 87 % и 86 %, соответственно.

4) Использование  $\text{Ca}^{2+}$  для стабилизации гидрогелей альгината не приводило к снижению жизнеспособности клеток HuTu-80 при внесении таких микросфер в среду инкубирования. Использование  $\text{Mn}^{2+}$  в концентрациях 0.3 М и 1 М приводило к достоверному уменьшению выживаемости, снижая этот показатель до  $73.0 \pm 6.1$  % и  $59.4 \pm 4.6$  %, соответственно.

5) Определено отсутствие апоптозиндуцирующего эффекта у *Lactobacillus fermentum* 3-2 и *Streptococcus lactis*, иммобилизованных в



микросферы альгината натрия, стабилизированные  $1 \text{ M Ca}^{2+}$ . Доля клеток в состоянии апоптоза в популяции при внесении капсул значимо не отличалась от варианта без обработки при инкубировании в течение 24 часов.