

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Оценка антимикробной активности внеклеточных метаболитов  
различных штаммов *Limosilactobacillus fermentum*

Работа завершена:

« 6 » 06 2023 г.



(М.А. Артемова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., заведующий кафедры генетики

« 6 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н.,

« 6 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1 Молочнокислые бактерии .....	9
1.1.2 Биотоп молочнокислых бактерий.....	9
1.1.3Классификация молочнокислых бактерий .....	10
1.2 Пробиотические препараты.....	11
1.3Антимикробные вещества .....	13
1.3.1 Органические кислоты.....	13
1.3.2 Пероксид водорода.....	14
1.4 Бактериоцины .....	15
1.4.2 Применение бактериоцинов.....	20
<b>Заключение</b> .....	21
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	22
2.1 Используемые штаммы бактерий .....	22
2.2 Питательные среды .....	22
2.4 Выделение бесклеточной культуральной жидкости .....	23
2.5 Осаждение сульфатом аммония антибактериальных веществ из лактобактерий .....	23
2.6 Оценка антибактериальной активности с помощью спот-теста.	24
2.7 Генетические методы .....	24
2.7.1 Выделение ДНК.....	24
2.7.2 Электрофорез .....	25
2.7.3 Секвенирование .....	25

2.7.4 Сборка и аннотация генома.....	26
2.7.5 Идентификация антибактериальных пептидов <i>in silico</i> .....	26
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>27</b>
3.1 Оценка антимикробной активности в культуральной жидкости лактобацилл без влияния рН .....	27
3.2 Влияние рН на антимикробную активность лактобацилл .....	28
3.3 Влияние температуры на антимикробную активность лактобацилл .....	31
3.4 Влияние протеолитических ферментов на антимикробную активность лактобактерий .....	35
3.5 Осаждение сульфатом аммония антибактериальных пептидов.....	38
4.1 Секвенирование и сборка генома <i>L. fermentum</i> AG16 .....	40
4.2 Аннотация генома <i>L. fermentum</i> AG16 .....	43
4.3 Идентификация в геноме <i>L. fermentum</i> AG16 генов, потенциально кодирующих АМП.....	44
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>46</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>47</b>



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
БД	база данных
АМП	антимикробные пептиды
КОЕ	Колонию образующая единица
LB	Питательная лизогенная среда Бергани
LA	Агаризованная питательная лизогенная среда Бергани
MRS	Питательная среда Де Мана, Рогозы и Шарпа

## ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях жизнедеятельности человечество постоянно подвергается неблагоприятным факторам среды, что в свою очередь влияет на микрофлору человека и ее взаимоотношения с организмом.

Тем не менее, одной из глобальных проблем по всему миру сегодня остается антибиотикорезистентность. В условиях пандемии 2019 года, повсеместно назначались антимикробные препараты. В первые месяцы COVID-19 масштабное использование антибиотиков во многом было связано с недостаточным количеством информации о заболевании [Ортенберг, 2019]. Для эффективного лечения необходимо знать, против какой бактериальной инфекции назначается антибиотик, но микробиологические анализы зачастую не проводились из-за очень большого количества пациентов и повышенного риска заражения медицинского персонала. Поэтому основой широкого применения антимикробных препаратов при COVID-19 по-прежнему оставался эмпирический подход [Ginsburg *et al.*, 2019]. Китайскими учеными было проведено первое ретроспективное исследование, которое показало, что частота назначения антибиотиков как у выживших, так и у умерших больных превышала 90%, в то время как противовирусная терапия проводилась лишь в 21% случаев [Zhou *et al.*, 2020]. Такое усиленное, и иногда нерациональное использование антибактериальных препаратов несомненно оказывает дополнительное давление на естественный отбор резистентных штаммов бактерий [Stanton, 2013].

Российская Федерация является соавтором резолюции по глобальной стратегии противодействия антимикробной устойчивости, принятой в 2014 году [резолюция ВНА 68.7, май 2014 г.] Правительством РФ была разработана и принята «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» [Распоряжение правительства РФ от 25 сентября 2017 г.]. Также создан

интернет-ресурс AMRmap, который позволяет в интерактивной форме получить данные по динамике лекарственной устойчивости (<https://amrmap.ru/>). Для преодоления этой проблемы были проведены мероприятия по совершенствованию контроля за рецептурным отпускem противомикробных препаратов для медицинского и ветеринарного применения. Также были приняты меры по созданию и производству продуктов питания, нормализующих микробиоту (пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков). Сегодня продолжается разработка и внедрение биологических лекарственных препаратов, в том числе препаратов на основе бактериофагов, иммунобиологических препаратов, иммуномодуляторов, пробиотиков для сокращения использования антибиотиков в растениеводстве и животноводстве [Распоряжение правительства РФ от 25 сентября 2017 г].

Политики во всем мире затрудняются сформулировать руководство по добавлению антибиотиков в корма для животных. Руководство для промышленности, выпущенное Центром ветеринарных препаратов Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (<https://www.fda.gov/>) рекомендуют использовать антибиотики только для профилактики, контроля и лечения инфекций у животных, но не для стимулирования роста, повышения продуктивности и повышения эффективности кормления. Кроме того, применение некоторых антибиотиков, имеющих решающее значение (например, цефалоспоринов третьего поколения), ограничено в животноводстве, и они предназначены только для применения у людей. Разработка подходящих альтернатив антибиотикам для клинического лечения инфекций домашнего скота, по-видимому, является насущной необходимостью [Allen *et al.*, 2013].

Ведутся серьезные дебаты о влиянии использования антибиотиков в сельском хозяйстве на здоровье человека. Существует опасение, что использование антибиотиков в пищу животным может привести к



распространению генов устойчивости к антибиотикам от животных к людям, особенно через бактериальные патогены человека [Stanton, 2013]

При дисбактериозах иммунитет ослабевает и организм подвергается воздействию различных патогенов, в том числе бактериальным инфекциям [Кутлин с соавт., 2020]. Ещё в прошлом столетии различные микроорганизмы были протестированы на их способность предотвращать и лечить болезни животных и человека [Fuller *et al.*, 1990]. Микроорганизмы добавляются в корм для домашних животных для усиления роста [Goldin *et al.*, 2019]. Некоторые кишечные бактерии могут снижать затраты энергии для иммунной системы, выделяя избыточные калории для увеличения веса. Дополнительные стимулирующие рост эффекты могут включать повышенное поглощение питательных веществ хозяином или ремоделирование бактериального сообщества в пользу неантагонистических или полезных бактерий и функций [Butaye *et al.*, 2003; Hardy, 2002].

Лактобактерии часто используют в качестве пробиотиков, благодаря их антагонистическим свойствам. Имеются доказательства того, что пробиотики могут действовать при лечении и профилактике инфекционных заболеваний [Yang *et al.*, 2019]. Антагонизм часто основан на выработке веществ, которые более или менее специфично ингибируют или инактивируют другие микроорганизмы. В основном, антагонизм вызывается бактериоцинами, которые представляют собой пептиды или белки, проявляющие антибиотические свойства [DeVuyst *et al.*, 1994; Dodd *et al.*, 1999]. Способность продуцировать бактериоцины часто обсуждается как желательное свойство пробиотиков [Salminen *et al.*, 1996].

Новые методологии генетики совместно с развитием молекулярных методов позволили идентифицировать и открыть новые роды и виды молочнокислых бактерий. Ранее в НИЛ «Молекулярная генетика микроорганизмов» был выделен ряд новых штаммов лактобактерий из

экскрементов здоровых людей и из силоса – естественных сред обитания лактобактерий.

Поиск новых штаммов необходим и интересен, так как спектр, выделяемых метаболитов, и, как следствие свойства лактобактерий очень штаммоспецифичны. Учитывая большое разнообразие свойств, проявляемых различными штаммами лактобацилл, скрининг новых изолятов, обладающих привлекательными биологическими и технологическими свойствами, остаётся одним из ключевых направлений в микробиологии [Silva *et al.*, 2020].

**Цель работы** – оценить антимикробную активность внеклеточных метаболитов различных штаммов *Limosilactobacillus fermentum* в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *P. aurescens* и *S. typhimurium*.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Оценить антимикробную активность культуральной жидкости штаммов *Limosilactobacillus fermentum* в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *S. marcescens*, *P. aurescens* и *S. typhimurium*.
- 2) Оценить влияние pH и температуры на антимикробную активность культуральной жидкости штаммов *Limosilactobacillus fermentum*, а также установить устойчивость метаболитов к протеолитическому расщеплению.
- 3) Провести выделение фракции пептидов из культуральной жидкости лактобактерий путем высаливания сульфатом аммония и проверить их антагонистическую активность.
- 4) Провести сборку и аннотацию генома *L. fermentum* AG16 *de novo* и идентифицировать в нем гены потенциальных антимикробных пептидов.



## СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

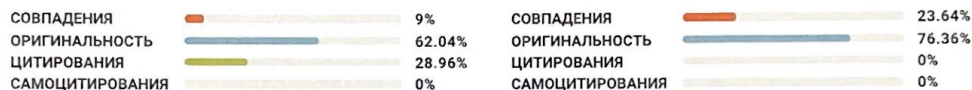
о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

### ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

**Автор работы:** Артемова Мария Александровна  
**Самоцитирование**  
**рассчитано для:** Артемова Мария Александровна  
**Название работы:** Оценка антимикробной активности внеклеточных метаболитов различных штаммов *lactiplantibacillus plantarum*  
**Тип работы:** Выпускная квалификационная работа  
**Подразделение:**

### РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 29.05.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 29.05.2023 12:51

**Структура документа:** Проверенные разделы: титульный лист с.1, содержание с.2-3, основная часть с.4-36, библиография с.37-47  
**Модули поиска:** ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс\*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирование по eLIBRARY.RU; Перефразирование по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирование по Интернету; Перефразирование по Интернету (EN); Перефразирование по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

**Работу проверил:** Каюмов Айрат Рашитович

ФИО проверяющего

**Дата подписи:**



Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.