

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01- биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

**Работа завершена:**

« 5 » 06 2022 г.



(Федорова М.С.)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель:

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2022 г.



(Каюмов А.Р.)

И.о. зав. кафедрой

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2022 г.



(Каюмов А.Р.)

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
1.1 Проблема биопленок в медицине .....	7
1.2 Механизмы резистентности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
1.3 Антибактериальные пептиды как возможная альтернатива противомикробной терапии.....	16
1.3.1 Антимикробные пептиды грамположительных бактерий .....	17
1.3.2 Стафилококкцины, продуцируемые <i>S. aureus</i> .....	20
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	23
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	23
2.1 Бактериальные штаммы.....	23
2.2 Питательные среды .....	23
2.3 Условия культивирования бактерий.....	23
2.4 Получение бесклеточной культуральной жидкости .....	24
2.5 Оценка жизнеспособности клеток с помощью резазуринового теста .....	24
2.6 Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста .....	24
2.7 Ультрафильтрация на PES-мембранах .....	25
2.8 Высаливание сульфатом аммония .....	25
2.9 Десорбция пептидов с клеток бактерий .....	26
2.10 Твердофазная экстракция .....	26
2.11 Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации .....	27
2.12 Статистическая обработка результатов.....	27

<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b> .....	28
3.1 Подбор оптимальной среды для культивирования клеток <i>S. aureus</i> для получения культуральной жидкости с наибольшей антибактериальной активностью .....	28
3.2 Влияние культуральной жидкости <i>S. aureus</i> на чувствительность клеток <i>P. aeruginosa</i> к антибиотикам.....	30
3.3 Подбор оптимальных условий для выделения метаболитов <i>S. aureus</i> , обладающих максимальной антимикробной активностью в отношении <i>P. aeruginosa</i> .....	33
3.3.1 Твердофазная экстракция антимикробных метаболитов из культуральной жидкости <i>S. aureus</i> .....	34
3.3.2 Получение активных противомикробных фракций культуральной жидкости стафилококка методом высаливания сульфатом аммония.....	37
3.3.3 Десорбция мембраносвязанных метаболитов с клеток <i>S. aureus</i> .....	38
3.3.4 Оценка размерного диапазона молекулярных масс антимикробных метаболитов <i>S. aureus</i> .....	39
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	42
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	43

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

LB	Питательная среда Лурия-Бертани
PBS	Фосфатный буфер
кДа	Килодальтон
ОП	Оптическая плотность
DMCO	Диметилсульфоксид
BM	Базовая среда
НИИ	Национального института здравоохранения
АМП	Антимикробные пептиды
ЦПМ	Цитоплазматическая мембрана
ТФЭ	Твердофазная экстракция
КЖ	Культуральная жидкость
МТТ	3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолиум бромид [реактив]
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
МБК	Минимальная бактерицидная концентрация
MWCO	Отсечение по молекулярной массе



## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время более 80% хронических инфекционных заболеваний во всём мире вызвано образованием бактериальных биопленок [Singh *et al.*, 2022]. Отличительной чертой бактерий в составе биопленки является повышенная устойчивость к антимикробным препаратам и иммунитету хозяина [Malone *et al.*, 2021]. Поэтому заболевания, вызванные биопленками, трудно поддаются лечению [Ding *et al.*, 2021]. К тому же, формирование биопленок на медицинских устройствах – одна из основных причин возникновения персистирующих и хронических инфекций у человека [Caldara *et al.*, 2022].

На сегодняшний день активное распространение антибиотикорезистентности представляет острую необходимость в создании новых антимикробных агентов, способных ингибировать или уничтожать биопленки [Blanco-Cabra *et al.*, 2021; Dostert *et al.*, 2021]. Поскольку на данный момент не имеется эффективных антимикробных агентов против инфекций, ассоциированных с образованием биопленок, открытие новых терапевтических стратегий для борьбы с биопленками является актуальной задачей [Simões *et al.*, 2021; Xuan *et al.*, 2021; Makabenta *et al.*, 2021].

Одной из альтернатив антимикробной терапии могут стать антимикробные пептиды (АМП) [Portelinha *et al.*, 2021]. Известно, что АМП способны повышать активность антибиотиков, действуя с последними синергетически [Grassi *et al.*, 2017]. Одними из продуцентов АМП являются бактерии [Vo *et al.*, 2021] и изучение антимикробных бактериальных пептидов имеет важное значение для разработки новых терапевтических подходов против бактериальных инфекций [Newstead *et al.*, 2020].

Бактерии *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* – одни из самых распространенных полирезистентных патогенов и возбудителей инфекционных заболеваний, способные проявлять взаимодействия как синергического, так и антагонистического характера в ко-культуре [Behzadi *et al.*, 2021; Little *et al.*, 2021; Cheung *et al.*, 2021]. Известно, что *S. aureus*

способен продуцировать АМП (ауреоцины), обладающие высокой бактерицидной активностью и повышающие активность известных антибиотиков в отношении различных микроорганизмов [Ceotto *et al.*, 2012].

**Целью** работы было выделить фракцию метаболитов *Staphylococcus aureus*, обладающих антибактериальной активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa*

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Подобрать оптимальную среду для культивирования клеток *S. aureus* с целью получения культуральной жидкости с наибольшей антибактериальной активностью;
- 2) Оценить влияние культуральной жидкости *S. aureus* на чувствительность *P. aeruginosa* к антибиотикам широкого спектра действия;
- 3) Разработать схему для выделения активной фракции антибактериальных метаболитов *S. aureus*.



**АНТИПЛАГИАТ**  
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

## СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

### ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

**Автор работы:** Федорова М.С.  
**Самоцитирование**  
**рассчитано для:** Федорова М.С.  
**Название работы:** Выделение и идентификация антимикробных бактериальных метаболитов  
**Тип работы:** Выпускная квалификационная работа  
**Подразделение:**

### РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ	0.69%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	0.69%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	98.87%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	98.87%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.44%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.44%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 07.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 07.06.2022 15:36

**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 (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Перефразирования 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.