

УДК: 619:579:615.33

## ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЛИЧИНОК *HERMETIA ILLUCENS* И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Смирнова К. Ю.- аспирант, Крылова Л. С.- магистрант, Ремизов Е. К.- аспирант, Горшунова С. В.- магистрант  
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, антимикробная активность, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*.

**Key words:** antimicrobial peptides, antimicrobial activity, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*.



### РЕФЕРАТ

В последнее время антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются исследователями как перспективный объект для создания антибактериальных препаратов нового поколения. АМП представляют собой молекулы врожденного иммунитета насекомых, которые в процессе эволюции обеспечивают их эффективную защиту от различных инфекционных агентов. С терапевтической точки зрения к преимуществам АМП можно отнести их активность против широкого спектра микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), быстрый киллинг, потенциально низкую вероятность развития резистентности, сопутствующий спектр противовоспалительных свойств. Широкое использование антибиотиков в качестве антимикробных лекарственных препаратов способствует селекции антибиотикорезистентных штаммов. В этой связи поиск новых перспективных антибактериальных агентов биологического генеза может стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, которые могут прийти на смену традиционным препаратам. Цель работы заключалась в выделении антимикробных пептидов из биомассы личинок *Hermetia illucens* и изучении их антимикробной активности. Для реализации данной цели необходимо было решить следующие задачи: выделить АМП из биомассы личинок, разделить белковые фракции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и изучить их антимикробную активность. В результате проведенного эксперимента было получено 7 белковых фракций из биомассы личинок *Hermetia illucens*. Изучена антимикробная активность выделенных белковых фракций. Выявлена антимикробная активность двух фракций, № 4 и 7, в первом случае по отношению к *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* шт. 1626, во втором – *Bacillus cereus* шт. ATCC 11778, *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* шт. 1626.

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых антибактериальных препаратов направленных на профилактику и терапию заболеваний животных является актуальным направлением развития животноводства, поскольку в современных условиях интенсификации сельского хозяйства промышленное разведение животных не возможно без использования антибактериальных препаратов [3]. Однако не контролируемое использование антибиотиков приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов, терапия заболеваний вызываемых этими штаммами затруднена [2]. В этой связи разработка антибактериальных препаратов нового поколения биологического генеза, направленных на терапию инфекционных заболеваний наряду с решением производственных вопросов будет способствовать поддержанию гомеостаза кишечного микробиома, а, следовательно, и здоровья животных [6, 7]. Антимикробные пептиды привлекают внимание ученых, поскольку обладают противомикробной, противогрибковой, противоопухолевой активностью и могут быть использованы для лечения заболеваний различного происхождения [5]. Цель исследования заключалась в индикации белковых фракций из биомассы личинок *H. illucens* и изучении их антимикробной активности. Разработанная нами методика выделения и разделения пептидов позволяет эффективно получать их из биомассы насекомых. Выявлены пептиды, обладающие антимикробной активностью к разным группам микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения АМП использовали биомассу личинок *Hermetia illucens*. Предварительно биомассу личинок измельчали, затем проводили экстракцию водорастворимых пептидов 0,1 М фосфатно-солевым буфером по разработанной нами методике. Ранее нами была разработана аналогичная методика для получения пептидов из биомассы личинок *M. domestica*, которая была взята за основу [1]. В зависимости от состава исследуемого образца методика может включать дополнительные стадии. ВЭЖХ проводили на

колонке BioSepS2000 300x2120 mm, при длине волны 280 нм, объем петли 1575 мкл, элюентом являлся 0,1 М фосфатно-солевой буфер. Антимикробную активность полученных белковых фракций определяли согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в трех повторностях [4]. Антимикробную активность определяли по отношению следующим культурам микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P); *Salmonella typhimurium* шт. 1626 были получены из государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; *Bacillus cereus* шт. ATCC 11778 был предоставлен ФГУ «ВГНКИ»; *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653 была получена из лаборатории «Российская коллекция патогенных грибов» ГБОУ ВПО Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было получено 7 белковых фракций из биомассы личинок *Hermetia illucens* (рис. 1).

Антимикробную активность определяли по отношению к различным микроорганизмам: *Bacillus cereus* шт. ATCC 11778, *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* шт. 1626. В результате проведенных нами исследований было выделены две белковые фракции (№ 4 и 7), обладающие антимикробной активностью. При этом в первом случае наблюдали антимикробную активность по отношению к *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* шт. 1626. При изучении белковой фракции № 7 была выявлена антимикробная активность по отношению ко всем изученным группам микроорганизмов (Таб.1.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

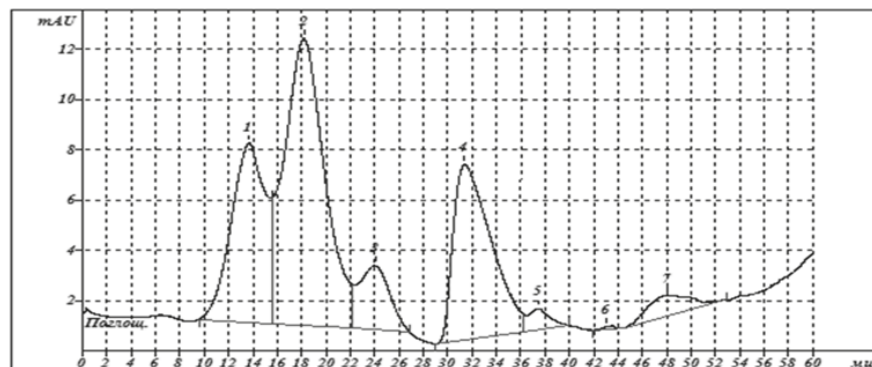
Среди множества АМП, выделенных из насекомых, танатин клопа-щитника

ПРОБА:

Пробирка №: 1  
Объем: 1575.0 мкл  
Разведение: 1.00  
Количество: 1.00

КОЛОНКА: BioSep SEC 2000 3000x2120  
Размер: 2.0x300 мм

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: 0.1 МФСБ  
Скорость подачи: 1.00 мл/мин  
МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА  
Метод расчета: Заказной  
Стандарт: Нет

| № | Время<br>мин | Высота<br>mAU | Площадь<br>mAU*сек | K'   | Разрешение<br>n, n+1 | ТТ   | Конц.<br>мкг/мл |
|---|--------------|---------------|--------------------|------|----------------------|------|-----------------|
| 1 | 13.7         | 7.13          | 1372.42            | 0.00 | 0.72                 | 114  | 0.8714          |
| 2 | 18.17        | 11.41         | 2665.01            | 0.00 | 0.98                 | 137  | 1.692           |
| 3 | 24.02        | 2.56          | 445.14             | 0.00 | 1.25                 | 430  | 0.2826          |
| 4 | 31.38        | 6.95          | 1496.14            | 0.00 | 1.22                 | 482  | 0.9499          |
| 5 | 37.4         | 0.83          | 107.19             | 0.00 | 1.89                 | 1929 | 0.06806         |
| 6 | 43.02        | 0.10          | 6.99               | 0.00 | 1.08                 | 8306 | 0.004439        |
| 7 | 48.06        | 0.81          | 201.88             | 0.00 | 0.00                 | 831  | 0.1282          |
| 7 | 60           | 29.79         | 6294.78            | 0.00 |                      | 1747 | 3.997           |

Отчет выдан программой МультиХром  
© 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рис. 1. Хроматограмма белковых фракций из биомассы личинок *Hermetia illucens*.

*Podisus maculiventris* активен в отношении ряда бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе антибиотикоустойчивых штаммов *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae*; гомезин, выделенный из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, обладает антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [6]. Выделенные нами антимикробные пептиды из личинок мух черная львинка *Hermetia illucens* обладали антимикробной активностью в отношении изученных в данном исследовании микроорганизмов.

## ВЫВОДЫ

Проведенные нами исследования позволили выявить две фракции антимикробных пептидов № 4 и 7, обладающие антимикробной активностью. При этом фракция №4 обладала антимикробной активностью по отношению к *Candida albicans* шт. РКПГУ-401/NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* шт. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* шт. 1626. Белковая фракция № 7 - по отношению ко всем изученным группам микроорганизмов. Полученные нами данные являются важным этапом в разработке антимикробных препаратов на основе анти-

Таблица 1

**Антимикробная активность водорастворимых пептидов, полученных из биомассы личинок *H. illucens***

| Фракция белка | Микроорганизмы                              |                                                     |                                                                         |                                                                     |
|---------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|               | <i>Bacillus cereus</i><br>шт. ATCC<br>11778 | <i>Salmonella</i><br><i>typhimurium</i> шт.<br>1626 | <i>Candida</i><br><i>albicans</i> шт.<br>РКПГУ-401/<br>NCTC-885-<br>653 | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i> шт.<br>ATCC 6538 (209<br>-P) |
| 1             | -                                           | -                                                   | -                                                                       | -                                                                   |
| 2             | -                                           | -                                                   | -                                                                       | -                                                                   |
| 3             | -                                           | -                                                   | -                                                                       | -                                                                   |
| 4             | -                                           | +                                                   | +                                                                       | +                                                                   |
| 5             | -                                           | -                                                   | -                                                                       | -                                                                   |
| 6             | -                                           | -                                                   | -                                                                       | -                                                                   |
| 7             | +                                           | +                                                   | +                                                                       | +                                                                   |

‘-’ бульон мутный или есть осадок (антимикробная активность не выявлена)

‘+’ бульон прозрачный (выявлена антимикробная активность)

микробных пептидов насекомых.

Isolation of antimicrobial peptides from larvae of *Hermetia illucens* and the prospect of their applying. Smirnova Ksenia Yurievna, 2 year post-graduate student, Krylova L.S., 1 year master's degree student, Remizov E.Ki., post-graduate student, Gorshunova S. Vl.- master's degree student, FSBEU HE "Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov"

**Isolation of antimicrobial peptides from larvae of *Hermetia illucens* and the prospect of their application**

**Smirnova K. Yu. post-graduate student; Krylova L.S., master's degree student, Remizov E.Ki., post-graduate student, Gorshunova S. Vl.- master's degree student, FSBEU HE "Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov"**

#### ABSTRACT

Nowadays antimicrobial peptides (AMPs) are considered by researchers as a promising object for development of a new generation of antibacterial drugs. AMPs are insect

innate immunity molecules that, during evolution, provide effective protection against various infectious agents. The benefits of AMP include their activity against a wide range of microorganisms (bacteria, viruses, fungi), fast killing effect, a potentially low probability of resistance, the accompanying spectrum of anti-inflammatory properties. The widespread administration of antibiotics as antimicrobial drugs resulted in the existence of antibiotic-resistant strains. Therefore, the search for new promising antibacterial agents of biological origin can be a prerequisite for the development of highly effective antimicrobial agents that can replace traditional drugs. The aim of the research was to isolate antimicrobial peptides from the biomass of *Hermetia illucens* larvae and to study their antimicrobial activity. To achieve this, it was necessary to solve the following tasks: isolate AMP from the biomass of larvae, separate protein fractions by high performance liquid chromatography and to study their antimicrobial activity. As

a result of the experiment, 7 protein fractions from the biomass of *Hermetia illucens* larvae were obtained. The antimicrobial activity of the isolated proteins fractions were studied. The antimicrobial activity of two fractions, N 4 and 7, were studied in the first case against *Candida albicans* str. РКПГУ -401 / NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* str. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* str. 1626, in the second case against *Bacillus cereus* str. ATCC 11778, *Candida albicans* str. РКПГУ -401 / NCTC-885-653, *Staphylococcus aureus* str. ATCC 6538 (209-P), *Salmonella typhimurium* str. 1626.

#### ЛИТЕРАТУРА

1.Индикация пептидов из биомассы личинок насекомых и изучение их антимикробной активности / Л.С. Крылова, Е.К. Ремизов, К.Ю. Смирнова, О.С. Ларионова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - 2019. - № 4 (44). - С. 3-6.  
2.Крылова, Л.С. Выделение антимикробных пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии из личинок *Galleria mellonella* и изучение некоторых их свойств / Л.С. Крылова, О.С. Ларионова, Я.Б. Древко // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы IX международ. конгресса. - 2017. - С. 478-480.

3.МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : метод. указания : введены 03.04.2004. – Москва : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

4.Патент № 2714128 Российская Федерация. Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения : № 2018142602 : заявл. 04.12.2018 : опубл. 12.02.2020 / Крылова Л. С., Древко Б. И., Фауст Е. А., Ремизов Е. К., Смирнова К. Ю., Древко Я. Б., Бородин М. А., Осина Т. С., Ларионова О. С. – 8 с.

5.Строение и биологические функции  $\beta$ -спиральных антимикробных пептидов / П.В. Пантелеев, И.А. Болосов, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова // ACTA NAT-URAE. – 2015. – № 1. – С. 39-50.

6.Antimicrobial peptides in 2014 / G. Wang, B. Mishra, K. Lau, T. Lushnikova, R. Golla, X. Wang // Pharmaceuticals. - 2015. – Vol. 8. – P.123-150.

7.Józefiak, A. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review / A. Józefiak, R.M. Engberg // Journal of Animal and Feed Sciences. – 2017. – Vol. 26. - P. 87–99.

**По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.**

**Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.**

**Тел/факс (812) 365-69-35,  
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,  
e-mail: 3656935@gmail.com**