

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Медико-профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

*На правах рукописи*

**АФЛЯТУНОВА ЭЛИНА РУСТЕМОВНА**

**БАКТЕРИОЦИНПРОДУЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА  
*LACTOBACILLUS FERMENTUM*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОСНОВЫ (ЗАКВАСКИ) ДЛЯ  
ПРИГОТОВЛЕНИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА "БУЗА".**

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор



А.Р.Мавзютов

## Оглавление

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений и условных обозначений                                                        | 4  |
| ВВЕДЕНИЕ                                                                                        | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ                                                                       | 8  |
| 1.1 Характеристика лактобактерий                                                                | 8  |
| 1.2 Роль лактобактерий в организме человека                                                     | 10 |
| 1.3 Применение лактобактерий в пищевой промышленности                                           | 14 |
| 1.4 Применение <i>Lactobacillus fermentum</i> в промышленности                                  | 16 |
| 1.5 Конкурентное исключение                                                                     | 17 |
| 1.6 Бактериоцинопродуцентная активность                                                         | 18 |
| 1.7 Образование лактобактериями кислот                                                          | 22 |
| 1.8 Образование лактобактериями пероксида водорода                                              | 23 |
| 1.9 Чувство кворума                                                                             | 24 |
| 1.10 Адгезия                                                                                    | 25 |
| 1.11 Морфологические характеристики лактобактерий                                               | 26 |
| 1.12 Методы окраски бактерий. Тинкториальная характеристика.                                    | 28 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ                                                        | 30 |
| 2.1 Объекты исследования                                                                        | 30 |
| 2.2 Определение тинкториальных и морфологических характеристик <i>Lactobacillus fermentum</i> . | 30 |
| 2.2.1 Методика окраски по Грамму                                                                | 30 |
| 2.2.2. Методика окраски по Циллю-Нильсену                                                       | 31 |
| 2.2.3 Методика окраски по Нейссеру                                                              | 32 |
| 2.2.4 Методика окраски по Бурри - Гинсу                                                         | 32 |
| 2.2.5 Методика окраски по Михину                                                                | 33 |
| 2.2.6 Методика окраски по Ожешко                                                                | 34 |
| 2.2.7 Методика окраски жгутиков по Морозову                                                     | 34 |
| 2.2.8 Методика окраски по Романовскому-Гимзе                                                    | 36 |
| 2.2.9 Метод висючая капля                                                                       | 37 |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.10 Метод раздавленная капля                                                           | 38 |
| 2.3 Приготовление питательной среды для культивирования<br><i>Lactobacillus fermentum</i> | 38 |
| 2.4 Приготовление инокулята и получение бесклеточного<br>культурального бульона           | 39 |
| 2.4.1 Очистка антибактериальных веществ                                                   | 39 |
| 2.4.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография                                          | 40 |
| 2.4.3 Масс-спектрометрия                                                                  | 40 |
| 2.4.4 Определение антимикробной активности                                                | 41 |
| 2.5. Определение пробиотических свойств                                                   | 41 |
| 2.5.1 Влияние ферментов на бактерицидную активность бактериоцинов                         | 41 |
| 2.5.2 Термостойкость и pH-стабильность бактериоцинов                                      | 42 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ                                          | 43 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ                                                                                | 43 |
| ВЫВОДЫ                                                                                    | 44 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ                                                                         | 45 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ- Высокоэффективная жидкостная хроматография

Г- Гуанин

ДНК -дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ-желудочно-кишечный тракт

КОЕ- колониеобразующие единицы

МПА- Мясопептонный агар

МПБ- мясопептонный бульон

ППС- плотная питательная среда

Ц- Цитозин

AI- аутоиндуктор

AU-arbitrary unit

Ig - Иммуноглобулин

in vitro -в искусственных условиях

in vivo- в естественных условиях

MRS-DE MAN, ROGOSA and SHARPE

Mr- Молекулярная масса

pH-водородный показатель

## ВВЕДЕНИЕ

Буза - традиционный башкирский напиток, известный своими свойствами благодаря штамму *Lactobacillus fermentum*. Это грамположительная палочка, относящаяся к роду *Lactobacillales* и выделенная из кисломолочного продукта «Буза».

Некоторые штаммы лактобактерий, такие как *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* и др. Способны продуцировать бактериоцины. Бактериоцины - антибиотики, подавляющие жизнедеятельность клеток других штаммов того же вида или родственных видов бактерий. В связи с этим бактерии рода *Lactobacillales* применяются в медицине с целью подавить рост болезнетворных бактерий.

Буза оказывает положительное влияние на организм человека. Она имеет в своём составе много белка, что укрепляет мышечную массу. Её свойства зависят от разновидности сырья на котором приготовлен напиток. Так буза, приготовленная на пшенице, имеет в своём составе много витаминов группы В, которые непосредственно оказывают влияние на нервную систему человека: повышают стрессоустойчивость и нормализуют сон. А также имеют огромное значение в клеточном метаболизме. Буза на пшенице имеет в своём составе необходимые человеку микро- и макроэлементы, такие как Калий, Магний и др.

Буза на геркулесовой или овсяной крупе обладает антиоксидантными свойствами, нормализует уровень холестерина и сахара в крови.

Буза на рисовой крупе так же имеет в своём составе большое количество витаминов группы В и Е, элементы Калий и Цинк. Укрепляет стенки сосудов и капилляр.

*Lactobacillus fermentum* широко применяется в пищевой промышленности в качестве природной закваски, при приготовлении кисломолочных продуктов, таких как буза, кумыс, катык, сметана и йогурт. Не редко штаммы *Lactobacillales* принимают участие при засолки,

мариновании овощей. Используется и молочная кислота, продуцируемая бактериями.

Лактобактерии принимают участие в брожении силоса, что подавляет рост плесени. Брожение силоса имеет огромное значение в сельском хозяйстве, так как силос является основным кормом для домашнего скота в зимний период.

Известны случаи успешной терапии мастита у кормящих женщин с помощью *Lactobacillus fermentum*, а так же профилактики пищевых отравлений.

В связи таким широким применением лактобактерий, а в частности штамма *L. fermentum* необходимо провести исследования, которые в будущем помогут рационально применить свойства этого микроорганизма в различных сферах жизнедеятельности человека.

**Цель работы.** Экспериментальная оценка бактериоцинопродуцентной активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза".

**Задачи исследования:**

1. Тинкториальная и культуральная характеристика штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза".
2. Получение и характеристика бесклеточного бульонного фильтрата *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза".
3. Экспериментальная оценка антимикробной активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза".
4. Экспериментальная оценка пробиотических свойств штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза".

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Характеристика лактобактерий

Штамм *Lactobacillus fermentum* относится к семейству *Lactobacillaceae*.

Лактобактерии это очень обширная группа ацидофильных бактерий. Относятся к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Lactobacillaceae*. Молочнокислые бактерии состоят из 11 родов : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pedicoccus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Род *Lactobacillus* включает 56 видов. В России не принята единая классификация.

Это род грамположительных бактерий. Микроаэрофилы или факультативные анаэробы, хемоорганотрофы не образующие спор и не образующие каталазу. Продуцируют лизоцим, лактоцидин, лактолин, реутерин и т.д. В ходе своей жизнедеятельности образуют пероксид водорода. В основе генома лежит ДНК, содержание Г+Ц — 54 мол%. Распространены в окружающей среде везде, где есть углеводы.

Одной из основных характеристик лактобактерий является их способность продуцировать молочную кислоту, которая подавляет рост условно-патогенных и патогенных бактерий. От состава и условий среды, в которой они культивируются, зависит интенсивность образования кислоты. Так же активность кислотообразования индивидуальна для каждого штамма. Например активность кислотообразования *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus rhamnosus* более выражена, чем у *Lactobacillus plantarum*.

Лактобактерии делятся на группы : гетеро- и гомороферментативные по отношению к синтезу углекислоты из глюкозы, потребности в тиамине, ферментации фруктозы до маннита и продукции фруктозодифосфат-альдозазы.

### Таблица 1

| № | Группы*                                         | Виды                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | <i>L. delbrueckii (delb)</i>                    | <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylotrophicus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fornicalis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. hamsteri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kitasatonis</i> , <i>L. psittaci</i> , <i>L. sobrius</i> , <i>L. ultunensis</i> |
| 2 | <i>L. salivarius (sal)</i>                      | <i>L. acidipiscis</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. algidus</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. apodemi</i> , <i>L. aviarius</i> , <i>L. equi</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. nageli</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. saerimneri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>L. vini</i>                                                                                                                                                                                                                                  |
| 3 | <i>L. reuteri (reu)</i>                         | <i>L. antri</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. gastricus</i> , <i>L. ingluviei</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. secaliphilus</i> , <i>L. vaginalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 4 | <i>L. buchneri (buch)</i>                       | <i>L. buchneri</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. parakefiri</i> , связанные с <i>L. acidifarinae</i> , <i>L. namurensis</i> , <i>L. spicheri</i> и <i>L. zymae</i>                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 5 | <i>L. alimentarius — L. farciminis (al-far)</i> | <i>L. alimentarius</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. nantensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. tuccei</i> , <i>L. versmoldensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 6 | <i>L. casei(cas)</i>                            | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>zeae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7 | <i>L. sakei (sakei)</i>                         | <i>L. curvatus</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. sakei</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 8 | <i>L. fructivorans (fru)</i>                    | <i>L. fructivorans</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. lindneri</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 9 | <i>L. coryniformis (cor)</i>                    | <i>L. bifermentans</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. rennini</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

| №  | Группы*                               | Виды                                                                                                                                                                                                                               |
|----|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                       | не сильно связанных с <i>L. composti</i>                                                                                                                                                                                           |
| 10 | <i>L. plantarum (plan)</i>            | <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i>                                                                                                                                                                 |
| 11 | <i>L. perolens (per)</i>              | <i>L. perolens</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>paracollinoides</i>                                                                                                                                                                |
| 12 | <i>L. brevis (bre)</i>                | <i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. parabrevis</i>                                                                                                                                                                       |
| 13 | <i>Pediococcus dextrinicus (Pdex)</i> | <i>P. dextrinicus</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. oligofermentans</i>                                                                                                                                                             |
| 14 | <i>Pediococcus</i>                    | 2 не связанных кластера: первый включает <i>P. cellicola</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. inopinatus</i> ; второй — <i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. pentosaceus</i> и <i>P. stilesii</i> |
| 15 | Пары                                  | <i>L. rossiae</i> — <i>L. siliginis</i> ; <i>L. vaccinostercus</i> — <i>L. suebicus</i> ; <i>L. manihotivorans</i> — <i>L. collinoides</i>                                                                                         |
| 16 | Одиночные виды                        | <i>L. kunkei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>Para-lactobacillus selangorensis</i>                                                                                                   |

\*Группы распределены в зависимости от числа видов, включенных в каждую группу.

## 1.2 Роль лактобактерий в организме человека

Лактобактерии занимают важную часть нашей жизни. Особое влияние они оказывают на пищеварительно-кишечный тракт и мочеполовую систему, составляя нормальную микрофлору.

В желудке содержатся в количестве - до  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/мл желудочного сока, в тонком кишечнике - до  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/мл кишечного сока, в толстом кишечнике -  $10^6$ - $10^8$  КОЕ/г фекалий.

Таблица 2. Основное распределение лактобактерий в здоровом организме человека.

| Местообитание               | Микроорганизм                                                                                                                                  |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ротовая полость             | <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. gasseri</i>                                      |
| Желудок                     | <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i>                                                                                      |
| Тонкий кишечник             | <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i>                                                                                    |
| Фекалии                     | <i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sakei</i> |
| Эпителий толстого кишечника | <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i>                                                                                |
| Влагалище                   | <i>L. jensenii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. fermentum</i>                                           |

Анализ формирования комплекса этих грамположительных неподвижных бактерий у здоровых детей на протяжении первых трёх месяцев жизни и роли матери в колонизации детей этими микроорганизмами показал, что у 40% рожениц в первую неделю после родов лактобациллы присутствуют в грудном молоке. Эти микроорганизмы обнаруживаются в отделяемом вагинального тракта и фекальном содержимом у всех здоровых женщин. Наиболее часто в исследуемых образцах рожениц, в толстом кишечнике детей первых месяцев жизни выявляются *L. reuteri*, *L. cosei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*. К трём месяцам жизни у 94% детей лактобациллы постоянно присутствуют в образцах фекалий.

Эти данные дали основание сделать заключение, что источниками лактобацилл, колонизирующих пищеварительный тракт новорожденных и детей первых трёх месяцев жизни, являются урогенитальный и желудочно-кишечный тракт матери и грудное молоко.

Лактобациллы обеспечивают защиту всего пищеварительного тракта благодаря антимикробной активности. Установлена эффективность применения некоторых лактобацилл в лечении острой инфекционной диареи и профилактики антибиотикассоциированной диареи и сокращение частоты рецидива диареи, вызванной *Clostridium difficile*.

Селективные штаммы успешно используются для лечения и профилактики бактериальной и вирусной диареи, гастроэнтеритов, вызванных *Helicobacter pylori*.

Эти микроорганизмы используются для лечения бактериальных инфекций урогенитального тракта, вагинозов, пищевой аллергии, кариеса зубов, группы болезней сопровождающихся повышением уровня IgE.

Молочнокислые бактерии оказывают губительное воздействие на патогенные штаммы и восстанавливают микробный гомеостаз за счёт межмикробных взаимодействий. Улучшают функции эпителиального барьера и активируют иммунный ответ.

Известны две основные категории факторов, которые способствуют оптимальному функционированию пробиотических штаммов лактобацилл: факторы, позволяющие оптимально адаптироваться к новой нише, которую они временно заняли в организме, то есть адаптационные факторы, и факторы, напрямую способствующие проявлению положительных эффектов лактобацилл, то есть пробиотические факторы. Эти категории полностью включены в определение пробиотических штаммов, включающих, прежде всего, живые и активные микроорганизмы, оказывающие положительный эффект на здоровье организма.

Молочнокислые лактобациллы активно применяют для терапии больных с различными воспалительными процессами верхних и нижних дыхательных путей, инфекциями мочеполовой системы.

*L.acidophilus* могут стимулировать рост других видов лактобацилл и бифидобактерии. Их используют как средства, снижающие липидную пероксидазу и как антиоксиданты. Имеются исследования, по которым эти бактерии используют для лечения опухолей. Они повышают иммунитет, стимулируя его различные звенья. Оральное назначение *L.acidophilus* более чем в 4 раза увеличивает IgA ответ.

В связи с принятием антибиотиков у детей и взрослых часто наблюдаются нарушения работы желудочно-кишечного тракта. Бактериальная терапия лактобациллами предотвращает риск появления у таких больных диареи.

Некоторые штаммы лактобактерий вырабатывают высокоактивную пероксида водорода, которая проявляет противовирусное воздействие. В высоких концентрациях *L. acidophilus* оказывает вирусоцидное действие в отношении ретровирусов.

Лактобациллы обладают выраженной антагонистической активностью и способностью к адгезии, что обуславливает важную роль этих микроорганизмов в поддержании колонизационной резистентности. На модели мышей, в организме которых отсутствуют все виды микроорганизмов, предварительно получивших дозу лактобацилл, было

показано, что эти молочно - кислые бактерии предотвращали колонизацию штамма *Helicobacter pylori*, который инфицирует различные области желудка и двенадцатипёрстной кишки человека и животных.

Имеются документированные факты, что лактобациллы (в особенности *Lactobacillus rhamnosus*), обладают выраженной способностью предупреждать обострение язвенного колита вызываемого *Clostridioides difficile*, оказывать высокое лечебное воздействие при диарее новорожденных, вызванных как бактериальными, так и вирусными патогенами.

Входящие в состав биоплёнки, покрывающей слизистые, микроколонии лактобацилл устойчивы к действию животного лизоцима, присутствующего в кишечном содержимом, а также к пищеварительным сокам, желче и кислотам. Штаммы *L. casei*, *L. fermentum* и *L. acidophilus* активно продуцируют лизоцимоподобный фермент.

Молочнокислые бациллы способны в больших количествах активно продуцировать органические кислоты (в первую очередь молочную), пероксида водорода и различных химических веществ, схожих по своим свойствам с антибиотиками. С этими продуцирующими способностями связана антагонистическая активность этих бактерий. Установлен факт выраженного влияния *L.acidophilus* на иммунную систему организма через стимуляцию миграции моноцитов, активацию фагоцитарной активности.

При хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта, таких как язвенная болезнь, гастриты, диарея, синдром раздражённого кишечника и др. больным назначают пробиотики, которые содержат лактобактерии. В результате этой терапии увеличивалось содержание иммуноглобулинов А и иммуноглобулинов G в желудочном соке, секреторного иммуноглобулина А в супернатантах фекалий при стабильных показателях сывороточных IgA и IgG.

В состав клеточной стенки молочнокислых бактерий входят пептидогликаны и тейхоевые кислоты, с которыми связано

иммуностимулирующее действие этих существ, так как такой тип клеточной стенки известен поликлональными индукторами иммуномодуляторов. Исследование противомикробной и иммуностимулирующей активности *L. plantarum* показало, что представители этого вида обладают выраженной способностью в анаэробных условиях образовывать уксусную и молочную кислоты, а также катаболизировать аргинин и генерировать окись азота (NO). NO, образующийся в кишечном тракте за счёт конститутивных ферментов лактобацилл, участвует в таких функциях кишечника, как бактериостаз, секреция мукуса, перистальтика, обеспечение местного иммунитета. Благодаря механизму выработки оксида азота и аминокислоте -аргинину, а также предупреждению склеивания, штамм *L. plantarum* имеет возможность предотвращать развитие инфекций, вызванных традиционными патогенами.

Таким образом, всем больным, находящимся на лечении рекомендуется употреблять молочнокислые продукты на основе лактобактерий.

### 1.3 Применение лактобактерий в пищевой промышленности

Одним из главных достижений в изучении лактобацилл является их успешное применение в продуктах питания и напитках, получаемые путём сбраживания. Эти животные занимают ведущую роль в ферментации.

Таблица 3. Продукты и напитки получаемые через брожение, и микробы, производящие ферментацию

| Получаемые продукты и напитки         | Микроорганизмы                                                                                                                  |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                     | 2                                                                                                                               |
| -Сыр                                  | <i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> ,<br><i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ,<br><i>L. helveticus</i> ,<br><i>L. casei</i> |
| - Йогурт<br>- Снежок<br>- Простокваша | <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>                                                                                         |
| -Ряженка                              | <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>                                                                                         |

| Получаемые продукты и напитки                                                                                                                      | Микроорганизмы                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - Ацидофилин                                                                                                                                       | <i>L. acidophilus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| -Кефир                                                                                                                                             | «Кефирные грибки», в т.ч.:<br><i>L. kefir</i> ,<br><i>L. kefiranofacies</i> ,<br><i>L. brevis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| -Кумыс                                                                                                                                             | <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ,<br><i>L. acidophilus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| -Айран                                                                                                                                             | <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| -Ферментированные сосиски<br>-Пепперони<br>-Салями                                                                                                 | <i>L. sakei</i> ,<br><i>L. curvatus</i> ,<br><i>L. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| -Квашеная капуста                                                                                                                                  | Сукцессия:<br><i>L. sakei</i> ,<br><i>L. curvatus</i> ,<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. brevis</i> □<br>Облигатно гетероферментативные:<br><i>L. brevis</i> ,<br><i>L. buchneri</i> □<br>Гомоферментативные:<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. curvatus</i> ,<br><i>L. sakei</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| -Солёные огурцы                                                                                                                                    | <i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. brevis</i> ,<br><i>L. pentosus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| -Квашеные овощи                                                                                                                                    | <i>L. fermentum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| -Ферментированные оливки                                                                                                                           | <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| - Хлеб из теста на закваске                                                                                                                        | <i>L. acidifarinae</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. alimentarius</i> ,<br><i>L. amylovorus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. spicheri</i> |
| -Тархана                                                                                                                                           | <i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ,<br><i>L. paraplantarum</i> , <i>L. casei</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| - Kenkey (сброженная кукуруза, применяется в традиционной африканской кухне)<br>- Коко (каша или напиток из сброженного проса в африканской кухне) | <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| -Виски                                                                                                                                             | <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

| Получаемые продукты и напитки         | Микроорганизмы                                                                                                    |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                       | <i>plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. ferintoshensis</i> , <i>L. suntoreyus</i>       |
| -Буза                                 | <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i>                                |
| -Квас                                 | <i>Lactobacillus sp.</i>                                                                                          |
| -Соевый соус                          | <i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. iners</i><br><i>L. farciminis</i> ,<br><i>L. pentosus</i> |
| -Доса (блюдо индийской кухни из риса) | <i>L. fermentum</i>                                                                                               |
| -Агбелима( мука африканской кухни)    | <i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. brevis</i> ,<br><i>L. fermentum</i>                                                |

#### 1.4 Применение *Lactobacillus fermentum* в промышленности

Лактобациллы являются пробиотиками. Пробиотики- это живые микроорганизмы, широко применяемые в медицине и промышленной сфере.

Среди лактобацилл основными штаммами, применяемыми для закваски полезных диетических кисломолочных бактерий являются *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus fermentum*.

Впервые молочнокислые бактерии использовали в целях терапии и профилактики человека только в 1910 году. Это связано с разработкой ацидофильного молока. На сегодняшний день молочнокислые бациллы нашли широкое применение в фармакогностике и пищевой промышленности входя в состав биологически активных веществ, биологически активных добавок и кисломолочных продуктов. Их вводят либо в моновидовом составе либо в комплексе с бифидобактериями.

Интерес к изучению лактобацилл на прямую связан с тем, что они влияют только положительно на организм человека, не вызывая патологические процессы.

В башкирской культуре широко известен кисломолочный напиток Буза, рецепт которого был перенесён из Азии вместе с монголо-татарским нашествием ещё в 13 веке. Это густой напиток цвета топленного молока, в

состав которого чаще всего входит геркулесовая крупа. Буза готовится на ферментативной основе - закваски, имеющей в своём составе штамм *Lactobacillus fermentum*.

### 1.5 Конкурентное исключение

Конкурентное исключение - антипатогенный механизм, характеризующий свойство пробиотиков, которые могут использовать те же ниши, что и патогенные микробы, и мешать проникновению в слизистый слой организма в следствии конкуренции за прикрепление к слизистой оболочке. Отличным примером может служить протеин у *Lactobacillus fermentum RC-14* с колагенсвязывающим свойством, который подавляет склеивание *Enterococcus faecalis* 1131. Коаггрегация - дополнительный механизм, уменьшающий патогенное воздействие инфекции, который облегчает очищение от возбудителей заболеваний слизистой оболочки. Ген *crf*, кодирующий поверхностный протеин, способствующий коаггрегации с *E.coli* K88, *Campilobacter coli*, *Campilobacter jejuni* обнаружен у *L. coryniformis* DSM20001T. Bergonzelli и его сотрудники описали роль клеточного поверхностно расположенного фактора GroEL у *L.johnsonii* NCC 533, участвующего в специфической агрегации *Helicobacter pylori*.

*Lactobacillus fermentum RC-14* и его поверхностноактивные вещества подавляют воспаление хирургических имплантов, вызванное *S. aureus*, это наиболее частая причина внутрибольничных инфекций, путём ингибирования адгезии патогенного штамма. Выявлена способность *Lactobacillus rhamnosus GR-1* и *L.reuteri RC-14* подавлять адгезию уропатогенного штамма *Escherichia coli*, вызывающего инфекцию мочеполовой системы. С одной стороны, молочная кислота и пероксида водорода, с другой стороны сами *Lactobacillus SCS* сильно тормозят рост патогенных бактерий и увеличивают активность белков внешней мембраны

А и Х, вызывая стресс и нарушая регуляцию белков, участвующих в прикреплении к клеткам хозяина.

### **1.6 Бактериоцинпродуцентная активность**

Многие штаммы лактобацилл секретируют антимикробные пептиды-бактериоцины это белковые вещества, продуцируемые некоторыми бактериями, подавляющие рост клеток того же вида, либо родственных видов. Бактериоцины состоят из протеинов и протеидов, разнообразных по размерам, отличающихся по типу микробной мишени, принципу воздействия на иммунную систему.

Американский учёный доктор Тодд Клаенхамер выделил бактериоцины, продуцируемые лактобациллами в три класса. Позже были проведены исследования, которые помогли выделить четвёртый класс.

Лантибиотики- первый класс, который состоит из небольших пептидов ( $M_r < 5\text{kDa}$ ), с аминокислотами лантионином и  $\beta$ -метиллантионином и с дегидратированными аминокислотами. Второй класс делится на три подкласса и включает в себя маленькие термически стабильные пептиды, которые не содержат аминокислоту лантионин ( $M_r < 5\text{kDa}$ ). *Listeria* - активные пептиды, выделяющиеся своей способностью секретировать пептиды. Для активного состояния им необходимы две составные части. К третьему классу относятся относительно большие термолабильные протеины ( $M_r > 30\text{kDa}$ ). На данный момент наиболее изученными классами являются первый и второй. Известны их биохимия, генетика и механизм действия.

Большинство бактериоцинов действуют с помощью увеличения проницаемости мембраны. В мембране чувствительной бактерии образуются небольшие поры за счёт рассеивания сил, которые активируют протоны. В связи с движением протонов теряется энергия и клетка погибает. По другому механизму эти протеины и протеиды действуют с помощью ферментативной активности, не задействовав мембранные поры. Для контроля продукции бактериоцина многие штаммы секретируют

феромон для чувства кворум, т.е. чувства собственного роста или способности координировать своё поведение за счёт секреции молекулярных сигналов. Оно предполагает способность микроба осуществлять продуцентную активность этих белковых веществ тогда, когда возрастает конкуренция за необходимую экологическую нишу и питательные компоненты.

Считается, что эти протеины и протеиды активны только по отношению к грамположительным микроорганизмам, и не проявляют воздействия на грамотрицательные в связи со строением клеточной стенки. Однако лактаины A16 и BH5 имеют активность по отношению к патогенной *H. pylori*, а низин за счёт разрушения наружной мембраны клеточной стенки. Ацидофилин 801 с молекулярной массой ( $M_r < 6,5 \text{ kDa}$ ) продуцирует *L. acidophylus* IBV801. Он имеет относительно небольшой бактерицидный спектр действия и активен к *E. coli* и *S. paratyphi* 1467, вызывающие диарею.

На данный момент рассматривается возможность использования бактериоцинов как пищевые консерванты.

Их применение в качестве терапии при желудочно-кишечных инфекциях ограничено, так как наиболее частым возбудителем являются ротавирусы и грамотрицательные микробы, не чувствительные к ним.

Не все штаммы лактобацилл продуцируют бактериоцины. Например при исследовании подавляющего компонента у *L. casei* sp. выяснилось, что он нечувствителен к воздействию высоких температур и ферментов, расщепляющих пептидные связи между аминокислотами и протеинами.

По мимо прочего ингибиторами могут выступать не только бактериоцины. *L. casei rhamnosus* GG продуцирует низкомолекулярное ингибирующее вещество, устойчивое к высокой температуре, отличающееся по составу от молочной кислоты. Эта субстанция подавляет рост *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.. *L. casei* subsp. *Rhamnosus* GR-1 и *L. acidophilus* 76 выделяют субстанцию, не похожую на пероксид водорода и молочную

кислоту, которая подавляет пиелонефритный штамм *E. coli*. Её молекулярная масса не больше 12-14 kDa. Оно сохраняет свою активность в буферном растворе, экстрагируется в хлороформе и не преципитируется при 80 % сернокислом аммонии.

У *L. delbrueckii* V11007 выявлены сразу три ингибитора, не имеющие отношение к молочной кислоте. Один из них является бактерициноподобной субстанцией. чувствительной к температуре и протеиназе. Её молекулярная масса составляет меньше 50 kDa. У *L. delbrueckii* LDD01 обнаружены протеазонечувствительные и вещества, активные с *K. pneumoniae*. Не зависимые по отношению к молочной кислоте. Молекулы, подавляющие рост *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>, выделенные от *L. rahmnosus* BK20 и *L. acidophilus* HN017, снизили активность за счёт комплекса действий фермента протеиназы, аминокислоты трипсина и фермента лактатдегидрогеназы. Так же *L. acidophilus* отделённая от нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животного и человека активна к штаммам, возбудителям диареи, *E. coli* на модели культуры клеток Caco-2/TC7. *L. acidophilus* подавляет рост *H. pylori*, что объясняется аутолитической активностью протеиноподобной субстанции, образующейся после гибели клетки. Возможно по тому же механизму и *L. johnsonii* La1 ингибирует рост, уреазную активность и адгезию к эпителиальным клеткам патогена.

Японский учёный Тияки Мукаи предложила другой механизм препятствования адгезии *H. pylori*. Согласно нему *L. reyteri* приклеиваются к центральному гликолипидному рецептору *H. pylori*.

Выработка бактериоцинов зависит от целого ряда факторов. Например от температуры, кислотности среды, окружающей атмосферы, источника азота, уровня запаса энергии и т.д. Они регулируются специальными системами, которые, в свою очередь, состоят из процесса, зависящего от концентрации клеток. Этот процесс затягивает пептидные феромоны для чувства кворума. Принцип регуляции небактериоцинных субстанций продуцируемых лактобациллами на данный момент не изучен.

Молочная кислота оказывает влияние на активность ингибиторов патогенных микроорганизмов, а так же на клеточную стенку грамотрицательных бактерий за счёт увеличения проницаемости внешней мембраны.

Ещё одним важным фактором вирулентности считается способность адгезии к эпителиальным клеткам желудочно-кишечного тракта. Благодаря этому микробы могут колонизироваться. Эти микробы задействуют клеточный цитоскелет самого организма, что сказывается на работе кишечника.

Как раз в этот момент молекулы, выделяемые лактобациллами, оказывают положительное влияние на кишечник, являясь препятствием для взаимодействия микробов и тканей кишечника. Они не дают патогенам проникать сквозь базальную пластинку кишечных клеток. Этот механизм до сих пор до конца не изучен, но есть предположение, что он происходит путём изменения экспрессии и/или действию мембраны бактериальных вирулентных факторов.

На данный момент развивается идея применения антимикробных пептидов из эпителиальной ткани, действующая по принципу первой линии химической защиты кишечника. Эти пептиды могут применяться как источник антибиотикоподобных молекул. Другими словами, они могут выступать в качестве инновационных антибиотиков. Сейчас ведутся клинические исследования, многие из которых дали положительный результат.

Пептиды проявляют свою активность даже при низких концентрациях, вне зависимости от молекулярной массы. Можно сделать вывод, что этот способ ингибиторного воздействия на бактерии, лучший, чем любой другой способ, состоящий из специфически активных компонентов. Однако не исключено, что повреждение клеточной стенки ведёт микроорганизм к его гибели. Всё же есть исследования, обращающие внимание на механизм присоединения пептидов к различным мишеням

цитоплазматической области бактерий. Существуют молекулы, выделяемые молочными бациллами, которые копируют механизм действия противомикробных пептидов самого организма.

У *L. fermentum* бактериоцины описаны у ряда штаммов, однако в базе данных (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>) нет охарактеризованных бактериоцинов *L. fermentum*, генетика бактериоцинов также совершенно не изучена.

### 1.7 Образование лактобактериями кислот

Основным оружием в конкурентной борьбе у молочных бактерий является продуцируемая ими молочная кислота. У разных штаммов её активность отличается. Отличается и степень её воздействия на различные виды. К примеру *L. rhamnosus* GG высокоактивна в отношении *S. enterica* serovar *Typhimurium*.

Молочная кислота понижает водородный показатель среды, тем самым повышая её кислотность. Так же как и бактериоциноподобные вещества, она оказывает влияние на клеточную стенку грамотрицательных микробов, увеличивая проницаемость её внешней мембраны, что позволяет комплексно воздействовать на него.

Сейчас ещё достаточно не изучен точный механизм влияния лактобактерий на другие микроорганизмы, не убивая его, однако существует предположение о pH-зависимом механизме. После нейтрализации культуры *L. casei rhamnosus* GG до значения pH=7, сразу нарушался механизм, в основе которого лактобациллы препятствовали инвазии *S. enterica* серовара *typhimurium* в культуру клеток Caco-2. Однако подавление роста *S. sonnei* связано не только со значением pH, но и является результатом действия внеклеточных и диффундирующих субстанций лактобацилл.

За счёт повышения кислотности среду через молочную и уксусную кислоты в значительной концентрации лактобациллы ингибируют патогены.

*L. lactis*, *L. casei shirota*, *L. acidophilus* YIT 0070 подавляли рост *E. coli* 0157:H7. *L. acidophilus casei* штамм Shirota благодаря молочной кислоте подавлял рост клинических изолятов *H. pylori* in vitro и in vivo. *L. acidophilus*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. bulgaricus* in vitro подавляли рост *H. pylori* выделяемой уксусной, молочной и хлористоводородной кислотам.

Рост таких патогенов как энтеротоксигенные кишечные палочки, энтеропатогенные кишечные палочки, синегнойная палочка, *E. cloacae* и *E. faecalis*, *S. flexneri* и *S. typhimurium*, ингибировала жидкость, полученная после центрифугирования *L. casei rhamnosus* Lcr35.

### 1.8 Образование лактобактериями пероксида водорода

Самое большое влияние в организме пероксид оказывает на вагинальную микрофлору. Перекись это ещё одно антимикробное оружие. До сих пор не известна генетическая основа её продукции. Пероксид водорода, полученный от *L. johnsonii* NCC533 в миллимолярных размерах подавляет рост бактерий рода *Salmonella*.

В микрофлоре влагалища здоровой пациентки всегда есть молочные бактерии, активно выделяющие перекись. При дисбактериозе влагалища появляются лактобактерии, не способные продуцировать  $H_2O_2$ . Благодаря пероксиду *L. crispatus* и *L. jensenii* ингибировали *Neisseria gonorrhoeae*. Около 80 % молочных бацилл, выделенных из вагинальной микрофлоры, оказывали подавляющее свойство по отношению к гарднереллам. И они же продуцировали  $H_2O_2$  и лактоцин. *L. breves*, *L. salivarius* и *L. gasseri* активны против гарднереллы, *S. aureus*, *L. crispatus* и *L. paracasei*. А так же прицеплялись к эпителиальным клеткам, конкурируя с вагинальными патогенами. Одним из антимикробных веществ, продуцируемых *L. delbrueckii* так же является перекись водорода. Так же известны антимикотические свойства пероксида водорода, что делает её эффективным средством в борьбе с грибковыми инфекциями урогенитального тракта.

## 1.9 Чувство кворума

Quorum Sensing или чувство кворума это способность некоторых микроорганизмов на молекулярном уровне контролировать выработку бактериоцинов. Любые перемены в окружающей среде остро сказываются на состоянии и численности микрофлоры. Будь то недостаток питательных веществ или субстрата, повышается конкуренция за них. Такие изменения требуют от микробных сообществ немедленного ответа и проявления адаптивных свойств.

Общение между грамотрицательными и грамположительными бактериям отличаются по своему механизму. У грамположительных микробов это система сигнальных молекул аутоиндукторов. Эта система имеет изменённые пептиды, оснащённые определёнными транспортными комплексами. Сигнальные пептиды связываются с восприимчивыми бактериям через специализированные молекулы 2CRSs. Выявлено наличие пяти сигнальных молекул QS 2CRSs у *L. plantarum* WCFS1, двух — у кишечных видов *L. acidophilus* NCFM и *L. johnsonii* NCC 533, одной — у кишечных видов *L. salivarius* UCC118 и пищевых видов *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC BAA-365, и ни одного у кишечных видов *L. gasseri* ATCC 33323. Есть предположение, что из-за такого значительного числа этих молекул у *L. plantarum* WCFS1 возможна модификационная изменчивость этих видов. Но они должны находится в растениях и ферментироваться продуктами питания. Возможно низкий уровень чувства кворума 2CRSs причина ограниченности других молочных бактерий.

Помимо взаимодействия между друг другом, бактерии могут общаться с организмом, применяя сигнальные пептиды Quorum Sensing. Помимо этих молекул, в общении задействованы и другие белки, такие как гормоны организма и гормоноподобные вещества микробов. Сигнальный белок AI-3, продуцируемый комменсалами и норадреналин могут активировать гены

патогенности энтерогеморрагической кишечной палочки за счёт индукции *ler* экспрессии AI-3 это ароматическая сигнальная молекула, исходная тирозина. Молочные бактерии являются барьером для распространения сигнальных пептидов. Супернатант *L. reuteri* ATCC 55730 подавлял негативный эффект от экспрессии локуса *ler* энтеропатогенной кишечной палочки.

Первое описание аутоиндуктора AI было сделано в конце 20 века. Он присутствовал как у грамположительных, так и у грамотрицательных микробов при их общении. У некоторых видов AI способен контролировать даже самостоятельное свечение. Например у *Vibrio harveyi*, делающей это через собственную фосфорилическую систему. Также она может биолюминисцировать от аутоиндукторов других микроорганизмов, что подтверждает универсальность AI.

Далеко не все лактобациллы могут выделять аутоиндукторы. Благодаря исследованиям Йос Вандерлейн и Сигрид Киирсмейкер подтверждены способности *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. casei*, продуцировать AI.

### 1.10 Адгезия

Для любой клетки способность к прикреплению играют большую роль. Чем дальше организм будет находиться в благоприятном для его роста месте, тем больше будет и его численность. В случае с лактобациллами это выгодно и им и самому организму. Чем дольше молочнокислые бактерии будут находиться в кишечнике, тем более успешна будет борьба с патогенами, следовательно и защита иммунной системы. Это свойство лактобактерий чаще всего изучается *in vitro*, то есть эксперимент проводят в пробирке. Для этого используют частицы кишечной ткани.

Способность к адгезии у лактобактерии зависит от конкретного штамма. У *L. acidophilus* LB сохранялись эти способности даже после гибели микроба. А при взаимодействии *L. casei rhamnosus* GG и *L. bulgaricus*,

увеличивалось приклеивание к слизи *B. lacti*, чего нельзя сказать об остальных штаммах. Взаимодействие клеток слизистой и лактобактерий нельзя объяснить только адгезией. Степень способности прикрепляться к стенками кишечника у разных штаммов варьирует, что говорит о штаммоспецифичной адгезии. Среди штаммов, проявляющих адгезивность к клеткам Caco-2, *L. casei rhamnosus* GG показали большую способность прикрепляться к кишечным тканям, чем *L. johnsonii* Lai и *L. casei* Shirota.

Адгезия это комплекс сил, свойств, и веществ, включающее в себя электростатическое движение, силу притяжения, гидрофобные силы, давление, липотейхоевые кислоты и другое. Благодаря муцинсвязывающим протеинам происходит распознавание и специфическое взаимодействие с лактобацилл со слизистыми тканями. За специфическую адгезию *L. plantarum* WCFS1 к эпителиальным клеткам кишечника отвечает маннозо-специфический адгезин. В штамме *L. reuteri* ATCC 100- 23 идентифицирован *Isp*- ген, кодирующий высокомолекулярный пристеночный протеин, *Lsp*.

### **1.11 Морфологические и культуральные характеристики лактобактерий**

При микроскопии грамположительные короткие и длинные палочки 2-5 мкм. Имеют овальные концы, некоторые расположены в цепочку. Размеры клеток зависят от питательной среды и варьируют в интервале 0,5-1,2×1,0-10 мкм.

При выращивании на MRS агаре и лактоагаре при 37±1°C в микроанаэроостате при анаэробных условиях и газогенерирующей системы GasPak+, в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO<sub>2</sub>, так и в аэробном режиме в течение 24-48 часов колонии S-формы 1-2 мм, выпуклые, гладкие, светло-жёлтого или белого цвета с ровными краями.

При выращивании на MRS бульоне при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24-48 часов в аэробных условиях рост - в виде помутнения бульона и выпадения бело - серого осадка на дне.

На белковых средах (МПА, МПБ, молоке) рост отсутствует (иногда наблюдается очень слабое развитие). Крахмал не гидролизует. Желатин не разжижает.

Растёт в интервале  $20-40^\circ\text{C}$ , оптимальная температура для роста составляет  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , мезофил.

Способен расти и размножаться при малом количестве кислорода, факультативный анаэроб. При глубинной ферментации на жидкой питательной среде оптимальный режим аэрации - перемешивания 1 объем воздуха / 1 объем питательной среды, что соответствует сульфитному числу 1.

Оптимальная среда для роста:  $\text{pH}=6,5\pm 0,2$ .

Отношение к источникам углеводов.

Хорошо растёт на: Glycerol+(48 h), D-Arabinose+(48 h), L-Arabinose+(24 h), D-Ribose+, D-Xylose+(48 h), D-Galactose+, D-Glucose+, D-Fructose+, D-Mannose+, L-Sorbose+(48 h), L-Rhamnose+, Inositol+(48 h), D-Mannitol+, D-Sorbitol+, Methyl- $\beta$ -D-Mannopyranoside+(48h), Methyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside+, N-Acetylglucosamine+, Amygdaline+, Arbutine+, Esculine citrate Fe+, Salicine+, D-Cellobiose+, D-Maltose+, D-Lactose+, D-Melibiose+, D-Saccharose+, D-Trehalose+, Inuline+(48 h), D-Melezitose+, D-Raffinose+, Amidon+, Gentiobiose+, D-Turanose+, D-Lyxose+(48 h), D-Tgatose+, K Gluconate+.

Не растёт на: Erythritol -, L-Xylose -, D-Adonitol -, Methyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside -, Dulcitol -, Glycogene -, Xylitol -, D-Fucose -, L-Fucose -, D-Arabitol L-Arabitol -, K 2-Cetogluconate K 5-Cetogluconate -.

Из спиртов усваивает: D-сорбит, D-маннит, глицерин, инозитол.

Из спиртов не усваивает: эритрит, D-адонитол, дульцитол, ксилит, D и L-арабитол.

Расщепляет: К- глюконат.

Не расщепляет: К 2-кетоглюконат, К 5- кетоглюконат, гликоген

Не усваивает цитрат, целлюлозу, этанол, бутанол.

Створаживают молоко через 12-14 часов.

Фенотипически апатогенный, т.е. не обладает гемолитической, протеолитической, летициназной, гиалуронидазной, антилизосимной, ДНК-ной и РНК-ной активностью.

### **1.12 Методы окраски бактерий. Тинкториальная характеристика.**

Микроскопический или бактериоскопический метод направлен на обнаружение в исследуемом материале бактерий - возбудителей инфекций и изучение их морфологических и тинкториальных свойств. Морфологические свойства характеризуются формой и размером клеток, а тинкториальные свойства – это способность бактерий вступать во взаимодействие с красителями. Отношение к различным красителям бактерий необходимо знать для идентификации микроорганизма и следовательно, для постановки точного диагноза и своевременного лечения.

Методы окраски в широком смысле делятся на две группы: простые и сложные. Простые методы - процесс, заключающийся в одном этапе окрашивания одним красителем, чаще всего используют основные анилиновые красители (основной фуксин, метиленовый синий и т.д.). Сложные методы -многоэтапный процесс, с использованием нескольких красителей, характеризующийся дифференциально-диагностической функцией.

Качество окраски мазка определяется рядом факторов: чистотой предметных и покровных стёкол; свойствами микробной культуры, её физиологической активностью, условиями культивирования; временем и характером фиксации, порядком нанесения красителей, экспозицией красителей во времени и др. В правильно приготовленном препарате

микробные клетки должны быть расположены в один слой. Фиксация мазков в клинической микробиологии необходима для снижения вирулентности исследуемой культуры и закрепления её на поверхности стекла. Фиксация мазков чаще осуществляется в пламени горелки или жидкими фиксаторами (смесью Никифорова или 5% формалином). Смесь Никифорова представляет собой смесь в соотношении 1:1 этилового спирта 96% и эфира (серноокислого) для наркоза. Время фиксации 10-15 мин.

Одним из самых распространённых простых методов окраски является окраска фуксином и генцианвиолетом, красного и фиолетового цвета соответственно. Перед окрашиванием готовится мазок на предметном стекле. Для этого на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды, с помощью бактериальной петли помещают в неё исследуемый материал и равномерно распределяют его на стекле до образования тонкого мазка. Препарат высушивают на воздухе, либо с помощью лакмусовой бумажки и фиксируют над пламенем горелки. После фиксации приступают к нанесению капли красителя на мазок либо мазок погружают в раствор красителей. Затем его промывают водой и высушивают, после чего его можно микроскопировать.

## ГЛАВА 2

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования является штамм *Lactobacillus fermentum*, выделенный из ферментативной основы (закваски) для приготовления традиционного башкирского кисломолочного напитка "Буза".

Штамм сохраняется в виде замороженного сырья при -20 градусов по Цельсию в бульоне MRS, содержащем 40% глицерина. Перед использованием дважды переносится в соответствующую среду и выдерживается в течение 24 часов в термостатированных условиях при 37 ° С.

### 2.2 Определение тинкториальных и морфологических характеристик *Lactobacillus fermentum*.

Для определения тинкториальных и морфологических характеристик планировалось провести окрашивание простыми и сложными методами.

#### 2.2.1 Методика окраски по Грамму

Определение строения клеточной стенки важное морфологическое исследование, позволяющее разделить микроорганизмы на две обширные группы : грамположительные и грамотрицательные. Метод получил название благодаря своему разработчику, датскому учёному Гансу Кристиану Граму.

Это многоступенчатое окрашивание, в основе которого лежит окраска анилиновыми красителями и окраска йодом.

На первом этапе на закрепленный мазок на предметном стекле с помощью стеклянной палочки наносится капля красителя генициан-фиолетового и выдерживает на протяжении одной минуты.

По истечении этого времени на мазок капают с помощью стеклянной палочки раствор Люголя, не смыв предварительно генициан-фиолетовый. И

оставляют на половину минуты. Затем мазок промывают с помощью этилового спирта, до тех пор, пока стекающая жидкость полностью не потеряет фиолетовые струи.

На следующем этапе предметное стекло помещают в ёмкость с водой и промывают. На исследуемый образец по центру наносят каплю водного фуксина и выдерживают на протяжении одной, двух минут. Последний этап заключается в повторном промывании водой и высушивании.

После этих манипуляций можно приступать к микроскопированию. Грамотрицательные микробы на первом этапе образуют не прочное соединение, разрушающееся под воздействием спирта, тем самым обесцвечиваясь. И связываясь с фуксином окрашиваются в красный цвет.

Грамположительные бактерии образуют сильную связь с красителем генициан-фиолетовым и йодом, не разрушающуюся под воздействием спирта. В результате уже не связываясь с фуксином, сохраняют синий цвет.

### **2.2.2. Методика окраски по Цилю-Нильсену**

Это методика разделения кислотоустойчивых микроорганизмов от некислотоустойчивых, получившая своё название от имени немецких учёных Франца Циля и Фридриха Нельсена.

На предметное стекло с предварительно фиксированным мазком кладут диск фильтровальной бумаги и осуществляют нанесение карболового фуксина. Мазок прогревают над горелкой до образования паров в течении от двух до пяти минут в зависимости от интенсивности пламени и объёма нанесённого красителя для облегчения проникновения красителя в клетки. Убрав фильтровальную бумагу, предметное стекло остужают и помещают в ёмкость с водой для смывания оставшегося красителя. Капают 5% раствор серной кислоты, после чего промывают в ёмкости с водой и наносят 1-2 капли метиленового синего. Оставляя так на три - пять минут. Мазок вновь промывают, высушивают и микроскопируют.

В результате кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в насыщенный красный цвет, окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются слабым раствором спирта. Некислотоустойчивые приобретают бледно синий цвет. По отношению к кислотоустойчивости можно судить о наличии или отсутствии в клетках липидов и воска.

### **2.2.3 Методика окраски по Нейссеру**

Эта методика позволяет обнаружить метахроматические включения волютина в цитоплазме микроорганизма.

На предварительно фиксированный мазок капают уксуснокислую синьку Нейссера, состоящую из одного грамма метиленового синего, двух миллилитров 96% этанола, пяти миллилитров концентрированной уксусной кислоты и ста миллилитров дистиллированной воды на три - четыре минуты. Предметное стекло промывают под чистой водой и наносят раствор Люголя на 40 секунд. Препарат снова промывают под водой и заключительным красителем наносят везувин на 30 секунд. По прошествии 30 секунд мазок промывают и можно приступать к микроскопированию.

Уксуснокислый синий вступает в реакцию с зёрнами волютина и окрашивает их в чёрный цвет. От промывания водой клетка теряет чёрный цвет, обесцвечиваясь, но оставляя окрашенными зёрна волютина. От воздействия везувина тело клетки окрашивается в коричнево - жёлтый цвет.

### **2.2.4 Методика окраски по Бурри - Гинсу**

Благодаря этой методики возможно изучение микроорганизмов на наличие или отсутствие капсул. Принцип этого метода состоит в том, что капсула не взаимодействует с красителями.

У непатогенных микроорганизмов капсулы выполняют роль защитного механизма от высыхания. Это структура белковой природы, которая

образуются в условиях стресса. Состоит из экзополисахаридов и покрывает клеточную стенку бактерий.

Патогенные микроорганизмы капсула защищает от иммунного ответа организма хозяина. Так патогены могут укрываться от фагоцитов с помощью гидрофильности и других свойств.

Исследуемую культуру смешивают с каплей чёрной туши и переносят на предметное стекло. Затем необходимо равномерно распределить микробную взвесь с тушью по предметному стеклу. Эта манипуляция осуществляется за счёт другого стекла со шлифованным краем. Распределение проводится под углом в 45 градусов. Полученный мазок необходимо высушить и зафиксировать над пламенем спиртовки. На мазок наносят водный фуксин и выдерживают одну - две минуты. На последнем этапе мазок промывают водой, пока не исчезнут излишки красителя и высушивают на воздухе в течении нескольких минут. После того как мазок высох, он готов к микроскопированию.

Капсулы проявляются на тёмном фоне за счёт негативного контрастирования. Капсулы остаются бесцветными.

### **2.2.5 Методика окраски по Михину**

Альтернативным методом для выявления капсул является метод по Михину.

На предварительно фиксированный мазок наливают метиленовую синьку Леффлера. В течении двух - трёх минут предметное стекло с мазком и красителем нагревают над пламенем спиртовки до образования видимых паров. Остудив предметное стекло, его промывают в чистой воде, до полного исчезновения излишек красителя.

Из-за нагревания капсулы становятся более восприимчивы к красителю и окрашиваются в нежно розовый цвет. Сами микроорганизмы приобретают насыщенный синий цвет.

### **2.2.6 Методика окраски по Ожешко**

Чтобы определить образует микроорганизм споры или нет применяют различные методики окраски. Одной из них является окраска по методу Ожешко. Споры бактерий играют важную роль в выживании их в окружающей среде. При неблагоприятной среде, бактерии способные на это, образуют споры и способны сохраняться, не подвергаясь физическим и химическим воздействиям на протяжении многих лет. Это оказывает огромное влияние на эпидемиологию многих инфекций.

Препарат не фиксируют, а готовят толстый мазок на краю стекла. Высушив, добавляют одну - две капли раствора 0,5 % соляной кислоты. Предметное стекло нагревают над пламенем горелки от одной до трёх минут в зависимости от толщины мазка до его закипания. Остудив препарат, с него аккуратным движением сливают лишнюю кислоту в специально отведённую для этого посуду. Мазок промывают в ёмкости с водой, высушивают на воздухе, а затем фиксируют над спиртовкой. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумажку и капают несколько капель карболового фуксина Циля. Повторно прогревают на спиртовке до образования видимых паров и наносят 5 % раствор серной кислоты на 30 - 40 секунд. Промыв чистой водой, добавляют либо синьку Леффлера, либо 1 % водный раствор малахитовой зелени. Выдерживают от трёх до пяти минут.

При использовании малахитовой зелени микроорганизмы приобретают зелёный цвет, а при использовании синьки Леффлера - синий. Споры, вступив в реакцию с фуксином, становятся тёмно-красного цвета.

### **2.2.7 Методика окраски жгутиков по Морозову**

Жгутики бактерий это тонкие белковые нити, состоящие из флагеллина. За счёт присутствия жгутика бактерия может двигаться, при его отсутствии бактерия самостоятельно двигаться не может. Жгутики являются важной

дифференциальной характеристикой микроорганизма, так как количество, расположение, движение жгутика различается в зависимости от вида микроорганизма. Так различают монотрихии - бактерии, имеющие один длинный жгутик. Амфитрихии - микробы, имеющие два жгутика, расположенные друг напротив друга. Лофотрихии - микробы, имеющие пучок жгутиков, исходящий из полюсов организма. Перитрихии - микроорганизмы со жгутиками по всей поверхности их клетки. Частота движения жгутика в среднем составляет от 240 Гц до 1600, в зависимости от конкретного микроба.

Жгутики есть как у прокариотов, так и у эукариотов, однако имеют значительные различия в строении и механизме работы.

Жгутики бактерий состоят из филамента или иначе говоря нити, базального тела, служащего своеобразным каркасом и крюка, соединяющего базальное тело и филамент.

Жгутики могут отрываться от бактерий при их обработке. Это становится причиной трудоёмкости обнаружения жгутиков.

Для выявления отношения микроорганизма к жгутикам применяется окраска по методу Морозова.

На первом этапе в пробирку с 1 мл чистой водопроводной воды вносят исследуемую культуру с помощью петли. Не размешивая эту культуру, а подождав от 30 минут до 1 часа, пока бактерии сами расплывутся по жидкости, культуру проверяют на подвижность в висячей капле. В случае отсутствия движения пробирку отправляют в термостат на одни либо двое суток.

Бактериальную массу наносят на предметное стекло и высушивают при комнатной температуре. Полученный мазок протравливают несколько минут. Для этого готовят три реактива.

В первом случае используют один мл ледяной уксусной кислоты и два мл формалина. К ним добавляют 100 мл очищенной дистиллированной воды.

Полученный раствор капают на мазок и выдерживают одну минуту. Слив излишки в специально отведённую посуду, мазок промывают водой и высушивают на открытом воздухе. Затем готовят второй реактив из пяти грамм таннина, одного мл фенола с разведением в 100 мл дистиллированной воды. Добавив второй реактив на исследуемый препарат его нагревают на не большом пламени от тридцати секунд до минуты. Остатки реактива сливают и препарат промывают в чистой воде.

Третий реактив готовят из смеси пяти грамм  $\text{AgNO}_3$  и 100 мл дистиллированной воды. Разделяют на 20 и 80 мл. К 80 мл раствора аккуратно капельно приливают водный раствор аммиака. Доводят до полного растворения осадка и появления опалесценции. Этот реактив добавляют на мазок и выдерживают одну две минуты, нагревая над пламенем. При проявлении коричневой окраски мазок промывают чистой водой и высушивают при комнатной температуре. Заключительным этапом является микроскопирование в светопольном микроскопе с приспущенным конденсором.

За счёт использования протравителя жгутики значительно увеличиваются в объёме, что облегчает задачу их исследования. Жгутики окрашиваются в темно коричневый цвет.

### **2.2.8 Методика окраски по Романовскому-Гимзе**

Этот метод получил своё название от имени своих первооткрывателей русского учёного Дмитрия Леонидовича Романовского и немецкого бактериолога Густава Гимзе. Он помогает оценить ацидофильные и базофильные свойства микроорганизмов.

До того как приступить к окрашиванию необходимо развести готовый краситель, состоящий из азура, эозина, метиленовой синьки, метанола и глицерина в дистиллированной воде в соотношении одна капля красителя на один мг воды, либо две капли красителя на один мг воды.

На чистое предметное стекло делается мазок с помощью бактериологической петли и высушивают при комнатной температуре. Каплей метилового спирта препарат фиксируют в течении трёх минут и высушивают на открытом воздухе.

Затем на мазок капают краситель и выдерживают при 37 градусах Цельсия пол часа. В завершении мазок промывают в ёмкости с чистой дистиллированной водой и высушивают на открытом воздухе. После этих манипуляций следует микроскопировать при масляной иммерсии.

Бактерии обретают малиново-красный оттенок. Их цитоплазма - голубой, а ядра красный. Этот метод так же широко применяется для окраски простейших.

#### **2.2.9 Метод висючая капля**

Это метод микроскопирования живых неокрашенных бактерий чтобы наблюдать наличие движения или его отсутствия у клеток, что является важной морфологической характеристикой. Такой подход даёт возможность исследовать свойства бактерий в неизменном виде. Был предложен немецким микробиологом Робертом Кохом в 1876 году.

В этом методе используется специальное предметное стекло, имеющее в центре углубление или лунку. Для начала стекло смазывают вазелиновым маслом недалеко от лунки для лучшей герметизации. Каплю с исследуемой бактериологической массой наносят на покровное стекло, а сверху аккуратно накрывают предметным стеклом так, чтобы капля попала в центр лунки. После этого исследуемый образец аккуратно и быстро устанавливают таким образом, чтобы покровное стекло было поверх предметного.

Иногда этот метод применяют для наблюдения за тем, как растут споры.

Такой препарат микроскопируют при темнопольном режиме.

### 2.2.10 Метод раздавленная капля

Ещё одним методом микроскопирования живых неокрашенных бактерий является метод раздавленной или надавленной капли.

Важным условием является соблюдение толщины предметного и покровного стекла. Так они должны составлять от одного до полутора мм и от 0,15 до 0,2 мм соответственно.

На предметное стекло капают микробную взвесь и плотно накрывают покровным стеклом, таким образом, чтобы микробная взвесь не вышла за пределы покровного стекла. Такие препараты часто окрашивают простыми методами, например 0,001 % раствора метиленовой сини или др..

### 2.3 Приготовление питательной среды для культивирования *Lactobacillus fermentum*

Характеристика культуральных свойств штамма является важнейшей характеристикой микроорганизма. Культуральные свойства лежат в основе принципа бактериологического исследования.

Планировалось культивировать *L. fermentum* на среде MRS. Эта среда была разработана De Man, Rogosa и Sharpe в 1960 году. Она активно применяется для культивирования и выделения молочнокислых бактерий.

Таблица 4. Состав среды MRS на 1000 мл дистиллированной воды

| Компонент                                       | г    |
|-------------------------------------------------|------|
| -дрожжевой экстракт □ □                         | 4.0  |
| -мясной экстракт □ □                            | 10.0 |
| -гидролизат казеина □ □                         | 10.0 |
| -цитрат аммония (двузамещенный)                 | 2.0  |
| - C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | 20.0 |
| -CH <sub>3</sub> COONa □ □                      | 5.0  |
| - TWEEN-80 □ □                                  | 1.0  |

| Компонент                                | г    |
|------------------------------------------|------|
| -гидроортофосфат калия □ □               | 2.0  |
| -MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O □ | 0.2  |
| -MnSO <sub>4</sub> •4 H <sub>2</sub> O   | 0.05 |
| Дополнительно : □ □ сорбиновая кислота   | 0.4  |
| -цистеин НС                              | 0.4  |

Для того чтобы получить ППС необходимо к указанным компонентам добавить 20 г агара.

Полученный бульон с водородным показателем 6.2–6.5 поставить в автоклав на 30 минут при 0.5 атм.

## 2.4 Приготовление инокулята и получение бесклеточного культурального бульона

*L. fermentum* планировалось выращивать в бульоне MRS (pH 6,4), в термостате при 37 ° С в течение 24 часов. По окончании роста микроорганизма культуральную жидкость планировалось центрифугировать при 6000 × g в течение 20 минут. Полученную бесклеточную культуральную жидкость использовать для дальнейшей очистки.

### 2.4.1 Очистка антибактериальных веществ

Для очистки противомикробных веществ планировалось использовать очистку жидкости ионообменной хроматографией с последующим гелефильтрованием. После ионообменной хроматографии с получением частично очищенных элюентов будет необходимо фракционировать методом гелефильтрации на колонке с сверхтонкой смолой Sephadex G-25 (1,5 x 50 см, об. 100 мл). Каждую фракцию (n = 45), элюированную с колонки, тестировать на антибактериальную активность против тест-культур *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis*. Фракции, проявляющие бактерицидные свойства,

планировалось объединять и выпаривать в вакууме при температуре 50-55 °С, при остаточном давлении 0,01 МПа.

#### **2.4.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография**

Фракции, полученные методом гель-фильтрации, планировалось очищать методом ВЭЖХ с применением различных систем (полупрепаративная колонка «Avex ODS» C18 (8 на 250 мм, Waters and Shimadzu); аналитическая колонка C18 Shimadzu LC-20 (4,6 с помощью 250 мм, Symmetry, с детектором Diode array SPD-20a, автоматический пробоотборник.) Элюент должен был состоять из бидистиллированной воды, трифторуксусной кислоты и ацетонитрила (ВЭЖХ «SIGMA»)). Объем впрыска образца 100 мкл. Элюирование планировалось контролировать в другом диапазоне длин волн 190-400 нм.

Детектирование планировалось провести при длинах волн 210, 254, 280 нм. Фракции, элюированные из колонки, планировалось лиофилизировать, растворять в 150 мкл бидистиллированной воды и тестировать на антибактериальную активность. Фракции, проявляющие максимальную антимикробную активность, было необходимо отобрать.

#### **2.4.3 Масс-спектрометрия**

Массовый анализ BCN планировалось регистрировать с использованием API 4000 в режиме электронной ионизации. Масс-спектрометр должен работать в режиме положительной ионизации распылением электронов с отношением массы к заряду в диапазоне от ста до двух тысяч  $m/z$ . Использование этого метода позволяет значительно экономить время и добиваться наиболее точных результатов при учёте концентраций.

#### **2.4.4 Определение антимикробной активности**

Антимикробную активность образцов (аликвоты по 100 мкл) планировалось оценить методом точечного газона, измеряя размер зоны подавления (диаметр) роста тестируемой культуры после 24-часовой инкубации в термостате при 30 °С. Антимикробную активность рассчитывают и выражают в произвольных единицах (AU / мл).

#### **2.5. Определение пробиотических свойств**

Штамм *L. fermentum* планировалось инкубировать в бульоне MRS с содержанием определённого количества желчи в течение 24 часов при 37 °С в термостате.

##### **2.5.1 Влияние ферментов на бактерицидную активность бактериоцинов**

Для исследования чувствительности бактериоцинов, различные ферменты, нейтрализованные образцы АМР, планировалось обрабатывать протеиназой-К (36 ед. / Мг, Sigma), трипсином (Pure из бычьей поджелудочной железы 3х, активность 2500 NFU / мг, HIMEDIA), пепсином (Extra чистый 1: 3000, HIMEDIA). Ферменты планировалось добавлять в образцы в конечной концентрации 0,5 мг / мл. После 2-часовой инкубации с протеиназой К и трипсином при 37 °С и пепсином при 25 °С образцы необходимо нагревать в течение 5 минут при 100 °С для инактивации ферментов и определять остаточные активности.

Выбор конкретно этих ферментов связан с задачей оценить пробиотические свойства, проявляющиеся в желудочно-кишечном тракте человека.

### **2.5.2 Термостойкость и pH-стабильность бактериоцинов**

Термостойкость планировалось определять после автоклавирования бактериоцина при 121 ° С в течение 15 мин. Для проверки стабильности при различных значениях pH аликвоты нейтрализованного BCN планировалось доводить до значений pH от 2 до 12, используя 4 М HCl и 4 М NaOH, соответственно, и затем инкубировать в течение 1 часа при 37 ° С. Остаточные активности измерять после нейтрализации аликвот до pH 5,5-6,0.

Статистический анализ. Были использованы приложения Microsoft Word и Microsoft Office Excel.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериоцинопродуцентная активность важное свойство *Lactobacillus fermentum*, имеющее высокий потенциал в применении для терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта, заболеваний урогенитального тракта, инфекций полости рта. Лактобактерии обладают высокой конкурентноспособностью, что ставит их в более выгодное положение для лечения инфекций бактериологической этиологии. Отсутствуют данные о возможном патогенном влиянии *Lactobacillus fermentum* на организм человека. Бактериоцины наиболее активны по отношению к грамположительным бактериям, что создаёт более узкий спектр воздействия.

Молочнокислые бактерии нашли широкое применение в пищевой промышленности. *Lactobacillus fermentum* используется при производстве продуктов питания и напитков, в том числе и традиционных блюд многих народов мира. Это связано с высокой ферментативной активностью, применяющейся при процессах брожения, что делает штамм *L. fermentum* наиболее перспективным для дальнейшего, более глубокого и активного изучения.

## ВЫВОДЫ

1. Исходя из анализа литературных данных можно сделать вывод, что наиболее оптимальными методами для тинкториальной характеристики штамма *L.fermentum* являются окраска по методу Грамма, так как это универсальный и основополагающий метод для изучения строения клеточной стенки микроорганизмов. Для культуральной характеристики наиболее подходящий метод является культивирование на среде MRS, так как она содержит все необходимые и доступные компоненты для культивирования и выделения лактобактерий.
2. Наиболее оптимальным методом приготовления инокулята и получения бесклеточного бульона штамма *L. fermentum* выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза" и дальнейшей характеристики бесклеточного культурального бульона является методика с применением ВЭЖХ и метод масс-спектрометрии, так как на данный момент это наиболее точные и информативные методики.
3. Для экспериментальной оценки антимикробной активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза" наиболее оптимальным методом является метод точечного газона благодаря своей доступности и универсальности.
4. Для экспериментальной оценки пробиотических свойств штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка "Буза" наиболее подходящим является метод исследования влияния ферментов на бактерицидную активность бактериоцинов, термостойкость и pH-стабильность бактериоцинов, так как пробиотические свойства необходимо оценивать в условиях, наиболее близких к условиям ЖКТ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев, В.Г. Пробиотики и пребиотики в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта / В.Г. Авдеев // Клин. фармак. и терап. журнал. — 2006. — Т. 42. — № 15. — С. 36-40.
2. Алешкин В. А. Становление пробиотикотерапии в России / В. А. Алешкин, С. С.Афанасьев, В. В. Пospelов // Вестник РАМН. — 2005. — Т. 12. — № 12. — С. 3-13
3. Барановский А. Ю. Дисбактериоз кишечника / А. Ю. Барановский., О. А. Кондрашина. — СПб.: Из-во СПбГУ, 2008. — 240 с.
4. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий / И.А. Баснакьян. — М.: Медицина, 2003. — 136 с.
5. Ботина С. Г. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биопленок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей / С. Г. Ботина, А. А. Глазова, И. В. Коробан, В. М. Червинец, А. М. Самоукина, О. А. Гаврилова, Д. В. Лебедев, А. Ю. Миронов.— М.: Клиническая лабораторная диагностика. — 2011. — 443 с.
6. Васильев Д.А. Методы общей бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков Л.В. Карпунина С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко. — Ульянов.: Из-во Ульяновской ГСХА. — 1998. — 222 с.
7. Воробьёв А.А., Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. / А. А. Воробьёв. — М.: Медицинское информационное агентство. — 2012. — 704 с.
8. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — М. : Academia. — 2003. — 462 с.

9. Калмыкова А.И. Пробиотики: терапия и профилактика заболеваний, укрепление здоровья / А. И. Калмыкова.— Новосибир.: Изд-во НГУ, — 2001.— 208 с.
10. Каширская Н. Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н. Ю. Каширская // Рус. мед. журн. — 2000.— Т. 34. — № 13-14. — С. 572-575.
11. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд. /А. И. Коротяев, С.А. Бабичев.— М.: СпецЛит, —2008. —760 с.
12. Лабинская А.С. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / А. С. Лабинская, Н.Н.Костюкова, С.М.Иванова. — М.: Из-во БИНОМ, — 2012. —1152 с.
13. Леванова, Г. Ф. Фенотоксономия и геносистематика лактобацилл / Г. Ф. Леванова , Е. И. Ефимов, Г. И. Григорьева. — Н. Новгород : Изд-во Ю. А. Николаев,— 2009. —248 с.
14. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований / В. В. Меньшиков.— М.: Лабора, —2009. — 880 с.
15. Пospelова В.В. Ацидофильные лактобактерии и их значение в системе средств, регулирующих бактериоценоз / В.В. Пospelова, М.А. Манвелова, Н. Г. Рахимова, Б. А. Шендеров. — М.: Медицинские аспекты микробной экологии, — 1991. — 360 с.
16. Пospelова В.В. Биологическая характеристика некоторых производственных и свежевыделенных штаммов лактобацилл. / В. В. Пospelова, М. А. Шабанская, Л. В. Морозова, Б. А. Шендеров. — М.: Медицинские аспекты микробной экологии, — 1992. — 110 с.
17. Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно.— Владим. гос. ун-т. Владимир : Изд- во ВлГУ, — 2005.—76 с.

18. Ратникова, И.А. Антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к возбудителям сальмонеллеза и колибактериоза : Автореф. дис. . канд. вет. наук: 16.00.03: защищена 19.04.1993 : утв. 01. 08. 1993 / И.А. Ратникова. — Казахский научно-исследовательский вет. институт. Алматы, 1993. — 15 с
19. Романова Ю. М. Бактериальные биоплёнки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю. М. Романова // Журнал микробиологии, иммунологии и эпидемиологии. 2011. — Т. 60. — с. 12-18
20. Семёнов А.В. Характеристика антагонической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях : автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.12: защищена 16.04. 2009: утв. 23. 08.2009 / А. В. Семёнов. —Оренбургская гос. мед. акад., — Оренбург, 2009. — 132 с.
21. Тулемисова Ж.К. Микробиологические основы создания и использования биопрепаратов пробиотического действия / Ж. К. Тулемисова. — Алматы : Из-во КНПУ, 2003.— 245 с.
22. Червинец Ю. В. Индигенные лактобациллы полости рта человека — кандидаты в пробиотические штаммы / В. М. Червинец, А. Ю. Миронов, С. Г. Ботина, Е. Ю. Гагарина, А. М. Самоукина, Е. С. Михайлова. — М.: Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье», 2012.—220 с.
23. Червинец Ю.В. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта / Ю.В. Червинец, В. М. Червинец , А.Ю. Миронов. — М.: изд. Центр Твер. гос. мед. ун-та, 2016. — 198 с.
24. Шендеров Б. А. Микрофлора пищеварительного тракта с важнейший фактор поддержания микрoэкологического гомеостаза хозяина / Б. А. Шендеров. — М.: Клиническое питание, — 2005. —662 с.

25. Bergonzelli, G. E. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori* / G. E. Bergonzelli // Infect. Immun. 2006. — V.153. — № 361. — P. 512 - 519.
26. Deraz, S. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 / S. Deraz // J. Ind. Microbiol. Biotechnol.— 2007. — V.54.— № 34. — P. 373-379.
27. Han, L. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects host adhesion-related gene expression after adhering to host / L. Han // Wei Sheng Wu Xue Bao. — 2011. — V.5. — №51. — P. 609-614.
28. Klebanoff, S. J. Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1 : possible role in heterosexual transmission / S. J. Klebanoff , R.W.Coombs // J. Exp. Med. —1991. — V.174.— №1.—P. 289-292.
29. Koczulla, A. R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential / A. R. Koczulla, R. Bals // Drugs. — 2003.— V.92. —№ 63. —P. 389-406.
30. Mukai, T. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glucolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri* / T. Mukai // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2002. —V.78. — № 32. — P. 105-110.
31. Neysens, P. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amlovorw* DCE 471 / P. Neysens, W. Messens, L. De Vuyst // Int. J. Food Microbiol. — 2003. — № 88. — P.29-39.
32. Pranita, D.T. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria/ E. C. Sara , L. M. Lisa // Clin Microbiol Rev.— 2012.—V.3 — № 25. — P. 450–470.
33. Ribet, D. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues / D. Ribet, P. Cossart // Microbes Infect. —2015. — V. 17(3). — P. 174-184.

34. Sazawal, S. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a metaanalysis of masked, randomised, placebo-controlled trials / S. R. Sazawal // Lancet Infect. Dis. — 2006. — V.54. — № 6.—P. 374-382.
35. Vanhoutte, T. Molecular monitoring of fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii* / T. Vanhoutte // Appl. Environ. Microbiol. —2006. —V.9.— № 72. — P. 5990-5997.
36. Vescovo, M. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon / M. Vescovo, G. Scolari, C. Zacconi // Food Microbiol. — 2006. — V. 23(7). —P. 905

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно. Используемые в работе материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них. Проверка в системе «Антиплагиат» выполнена.

Уровень оригинальности работы составляет \_\_\_\_%.

Работа изложена на \_\_\_\_ страницах машинописного текста, содержит \_\_\_\_ таблиц, \_\_\_\_ рисунков. Библиографический список включает \_\_\_\_ источников, из них \_\_\_\_ отечественных и \_\_\_\_ иностранных авторов.

\_\_\_\_\_

---

*подпись Фамилия, Имя, Отчество полностью*

«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ**



## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Автор работы            | АФЛЯТУНОВА ЭЛИНА РУСТЕМОВНА                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Подразделение           | Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Тип работы              | Выпускная квалификационная работа                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Название работы         | БАКТЕРИОЦИНПРОДУЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА LACTOBACILLUS FERMENTUM, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОСНОВЫ (ЗАКВАСКИ) ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА "БУЗА"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Название файла          | ВКР Афлятунова.Э.Р. 4 (1).docx                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Процент заимствования   | 26.71 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Процент самоцитирования | 0.00 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Процент цитирования     | 0.67 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Процент оригинальности  | 72.62 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Дата проверки           | 08:34:37 10 июня 2020г.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Модули поиска           | Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль поиска "БГМУ"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов |
| Работу проверил         | Кобзева Наталья Рудольфовна<br>ФИО проверяющего                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Дата подписи            | 10.06.2020<br>ФГБОУ ВО БГМУ<br>Минздрава России<br>НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА<br>Подпись проверяющего                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |



## ОТЗЫВ

на \_\_\_\_\_ выпускную квалификационную работу обучающегося группы \_\_\_\_\_ Б 401 А  
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)  
Афлятунова Элина Рустемовна  
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Бактериоцинопродуцентная активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка «БУЗА»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию  
Объем текстовой части ВКР составил 49 листов А4, 4 таблицы. Работа содержит традиционную концепцию выпускной квалификационной работы. В литературном обзоре проведён анализ большого количества литературы. Рассмотрены характеристики представителей семейства *Lactobacillaceae*. В главе материалы и методы приведено описание объекта исследования и методики работы с ней. Список использованных источников состоит из 36 наименований отечественных и зарубежных авторов.

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР). Методы и способы решения конкретных проблем, представленных в ВКР, основные достоинства и недостатки ВКР. Работа имеет актуальное направление. Лактобактерии всё чаще становятся объектом исследования в связи со своими свойствами. Методы и способы исследования представленные в ВКР можно охарактеризовать как современные и оптимальные. Большими достоинствами работы являются её научная ценность и точность приведённых фактов

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач.

Студент зарекомендовал себя как трудолюбивый и самостоятельный исследователь. К научной работе подошла с большим интересом и выполняла все поставленные задачи продуманно и ответственно. Показала свою практическую и теоретическую подготовленность на высоком уровне. Из этого я делаю заключение, что выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.  
В процессе написания студент продемонстрировал умение работать с такими программами, как Microsoft Word, Microsoft Excel.

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. Выпускник использовал научную, справочную и научно-техническую литературу и показал своё умение анализировать прочитанный материал.

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

Автор работы соблюдал календарный график подготовки ВКР

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Работа оформлена в соответствии с требованиями требованиям ФГОС ВО по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат).

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).  
Замечаний к работе нет.

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое.

Результаты полученные в процессе исследования могут быть использованы в публикациях и дальнейших реализаций в учебном процессе.

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. Оценка выпускной квалификационной работы «Отлично» и рекомендуется для присвоения квалификации Бакалавр.

Руководитель выпускной квалификационной работы

Мавзютов Айрат Радикович, профессор

• \_\_\_\_\_  
(Фамилия, имя, отчество, должность)

  
\_\_\_\_\_  
(Подпись)

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ года

## РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б 401 А  
(Форма выпускной квалификационной работы)

(Шифр группы)

Афлятунова Элина Рустемовна

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Бактериоцинопродуцентная активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка «БУЗА»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.  
Выпускная квалификационная работа Афлятуновой Э.Р. была представлена в полном объеме на 49 страницах. Работа выполняет задание, выданное кафедрой, а именно оценка бактериоцинопродуцентной активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка «БУЗА»

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения.  
Рецензируемая выпускная квалификационная работа имеет актуальное направление в микробиологии. Применение пробиотиков в лечебных целях является одним из ведущих направлений нанобиотехнологии. Автор ответственно подошёл к решению этого своих задач

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.  
В работе приведены характеристики лактобактерий, их широкое применение в современном производстве, в частности штамма *Lactobacillus fermentum*. Рассмотрены механизмы продукции бактериоциноподобных веществ и их действия на патогенные микроорганизмы. А так же других ингибиторных свойств лактобактерий, таких как продукция молочной кислоты и перекиси водорода.

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.  
Работа касается вопросов, связанных со здоровьем населения.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств  
В ходе работы студент использовал стандартные программные средства Microsoft Word.

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. \_\_\_\_\_

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач.  
Судя по проделанной работе можно сделать вывод, что автор хорошо подготовлен к самостоятельной работе и рекомендуется к допущению выполнения профессиональных задач.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.  
Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ № 944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат).

9 Обоснованность выводов и предложений  
В результате выполненной работы обучающаяся отвечает на поставленные задачи и делает заключение в соответствии со своей целью.

10 Замечания по усмотрению рецензента. Замечаний нет.  
(дополнительные замечания представлены на листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.  
Работа даёт возможность использования теоретических знаний для дальнейших научных работ и практических применений этих знаний.

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Считаю, что уровень выпускной квалификационной работы соответствует оценке "отлично" и рекомендуется для присвоения студенту-выпускнику квалификации Бакалавр.

• Рецензент  
зав. ЦНИЛ, доцент кафедры ФПМ  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России  
(Место работы, занимаемая должность)  
М.П.\*

*Моч*

Мочалов К.С.  
(Инициалы и фамилия)

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ года

## РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б 401 А

(Форма выпускной квалификационной работы)

(Шифр группы)

Афлятунова Элина Рустемовна

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Бактериоцинпродуцентная активности штамма *Lactobacillus fermentum*, выделенного из ферментативной основы (закваски) для приготовления кисломолочного напитка «БУЗА»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Объем текстовой части и иллюстрационно-графического материала работы составил 49 страниц. Работа выполненная в традиционном стиле, сохраняя основную концепцию и содержит такие главы, как: введение, литературный обзор, описание объекта исследования и методов исследования, заключение и выводы, список использованной литературы.

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения.

Отличительной чертой работы является её актуальное направление. Исследование бактериоцинпродуцентной активности лактобактерий и её применение в медицине и в промышленности несёт собой научную ценность.

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.

Работа выполнена полноценно, проработан большой объем литературы. Подобраны наиболее оптимальные методы работы с исследуемой культурой. Методики являются современными и доступными. Полученные теоретические данные в ходе выполненной работы могут быть применены в практической научной деятельности в борьбе с бактериальными заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.

Работа касается вопросов, связанных со здоровьем населения.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств

В работы применены статистические анализы с использованием приложений Microsoft Word и Microsoft Office Excel.

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач.

Автор работы готов к выполнению самостоятельного научного исследования и выполнению профессиональных задач.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Качество оформления текстовой части и иллюстрационно-графического материала соответствует требованиям действующих стандартов и регламентов.

9 Обоснованность выводов и предложений

Автор работы чётко отвечает на поставленные задачи, делает обоснованные выводы и заключение, отвечающее поставленной цели.

10 Замечания по усмотрению рецензента. Замечаний нет.

(дополнительные замечания представлены на листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.

Результаты, выпускной квалификационной работы рекомендуются для дальнейшей публикации.

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Таким образом, можно сделать вывод, что данная выпускная квалификационная работа соответствует всем требованиям и заслуживает оценки «отлично» и рекомендуется к присвоению студенту-выпускнику квалификации степени Бакалавр.

Рецензент

(Место работы, занимаемая должность)

« 20 » года

Личную подпись

Завещаю

Зав. отделом кадров  
ФБУН «Уфимский НИИ Медицины  
труда и экологии человека»

(Инициалы и фамилия)