

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

Мирзаянова Миляуша Каримовна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА
BACILLUS ALTITUDINIS API – 2019**

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор



Т.В.Маркушева

Уфа – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 6 |
| 1.1. Краткая характеристика биосурфактантов..... | 6 |
| 1.1.1. Рамнолипиды | 8 |
| 1.1.2 Трегалоллипиды | 10 |
| 1.1.3. Софоролипиды | 11 |
| 1.1.5. Липопептиды и липопротеины | 12 |
| 1.1.6. Жирные кислоты, фосфолипиды и нейтральные липиды. | 14 |
| 1.2. Род <i>Bacillus</i> | 15 |
| 1.2.1. Род <i>Bacillus</i> в образовании биосурфактантов. | 16 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 18 |
| 2.1. Приготовление питательных сред для культивирования штамма <i>Bacillus altitudinis</i> | 18 |
| 2.2. Методы посева бактерий | 18 |
| 2.3. Рост штамма <i>Bacillus altitudinis</i> в жидкой среде..... | 20 |
| 2.4. Выделение препаратов ДНК | 21 |
| 2.5. Выделение ДНК с помощью Chelex..... | 21 |
| 2.6. Определение антибиотикоустойчивости | 21 |
| 2.7. Определение устойчивости <i>Bacillus altitudinis</i> к антибиотикам (ампициллин, тетрациклин и хлорамфеникол) методом ПЦР | 22 |
| 2.8. Детекция генов сурфактантов у <i>Bacillus altitudinis</i> методом ПЦР...23 | 23 |
| 2.9. Измерение эмульгирующей активности. | 24 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 26 |
| 3.1. Морфологические и тинкториальные характеристики чистой культуры. 26 | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Физиолого – биохимические признаки <i>B. altitudinis</i> | 27 |
| 3.3. Подбор праймеров для молекулярно-генетического анализа. | 29 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 31 |
| ВЫВОДЫ | 33 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 35 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП - антибактериальный препарат

ДДМ - диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МПК - минимальная подавляющая концентрация

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

дцДНК – двухцепочечная ДНК

оцДНК – одноцепочечная ДНК

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

биоинформационную базу данных

NCBI –National Center for Biotechnological Information

LB – Lysogeny broth

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

ВВЕДЕНИЕ

Биосурфактанты – поверхностно-активные вещества (ПАВ), образующиеся различными видами микроорганизмов.

Физиологическая роль биосурфактантов связана с эмульгированием питательных компонентов, обеспечением процессов слипания клеток к веществам, их освобождение с поверхности, проявлением антибактериальной и противогрибковой активности и рецепторов для бактериофагов.

Установлено 5 классов биосурфактантов: гликолипиды; липополисахариды и полисахарид-липидные комплексы; липопептиды; жирные кислоты и нейтральные липиды.

За последние несколько лет микроорганизмы, синтезирующие биосурфактанты, вызывает значительный интерес как в теоретическом, так и практическом плане. Изучение направлено преимущественно на решение вопросов их использования в биотехнологических направлениях, в пищевой и косметической промышленности, в агрономии.

Цель работы: выявить физиолого-биохимические характеристики штамма *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019.

Задачи исследования:

- 1) изучить особенности синтеза поверхностно-активных веществ *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019;
- 2) методом ПЦР провести детекцию генов сурфактантов (сурфактина, фенгицина и итурина) у *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019
- 3) методом ПЦР определить чувствительность *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019 к антибиотикам (ампициллин, тетрациклин и хлорамфеникол);
- 4) установить особенности роста *Bacillus altitudinis* на синтетических средах с добавлением производных фенольной природы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Краткая характеристика биосурфактантов.

Биосурфактанты – поверхностно-активные вещества (ПАВ), продуцируемые микроорганизмами, включая *Bacillus spp.* Они полезны не только как антибактериальные, противовирусные и противогрибковые соединения, но в свою очередь вызывают распад биопленок и проявляют антиадгезионную активность (Balan SS, Mani P, Kumar CG, Jayalakshmi S., 2019).

Биосурфактанты обладают рядом преимуществ над синтетическими поверхностно-активными веществами:

- Высокое биологическое разложение (биосурфактанты легко разлагаются, чем синтетические поверхностно-активные вещества, это позволяет использовать их без нанесения вреда окружающей среде) (Lima et al., 2011);

- Низкая вирулентность, высокая биологическая совместимость (возможность использования биологических ПАВ в разных отраслях, таких как, пищевой, сельскохозяйственной, косметической и фармацевтической промышленности) (Desai and Banat, 1997; Gautam and Tyagi, 2006);

- Высокая активность при экстремальных условиях температуры, pH, солёности (Abouseoud et al., 2008);

- Структурное и функциональное разнообразие (преимущество подборки биологически поверхностно-активных веществ с заданными свойствами для целевого применения) (Desai and Banat, 1997);

- Дешевое восстанавливающее сырье для получения (например, использование отходов пищевой промышленности) (Makkar and Cameotra, 2002; Maneerat and Songklanakarin, 2005)

По химическому строению биосурфактанты представляют собой амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной (содержит кислоты, моно-, ди- и полисахариды, пептиды) и гидрофобной частей (насыщенные и ненасыщенные углеводорода, жирные кислоты), которые снижают поверхностное и межфазное

натяжение, что является причиной взаимосвязи с поверхностями различных полярностей (Ron E., Rosenberg E., 2001).

По молекулярной массе биосурфактанты делят на две группы: низкомолекулярные биосурфактанты и высокомолекулярные полимерные сурфактанты.

К первой группе относятся: гликолипиды, жирные кислоты, фосфолипиды, липопептиды, которые обладают высокой поверхностной и межфазной активностью, способностью к образованию стабильной эмульсии, малой критической концентрацией мицеллообразования.

В следующую группу входят: полисахариды, протеины, липопротеины, липосахариды, обладающие способностью эффективно адсорбироваться на различных поверхностях при низкой концентрации, то есть обладают высокой эмульгирующей активностью, но поверхностное натяжение остается неизменным (Ron E., Rosenberg E., 2001; Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A., 2010). Гликолипиды и липопептиды относятся к широко изученным низкомолекулярным биосурфактантам. Применение гликолипидов является наиболее интересными в биомедицине. Каждая группа проявляет различные свойства и физиологические функции.

Продуцентами биосурфактантов являются представители трех доменов: *Bacteria*, *Eucarya*, *Archaea*, существует возможность их получения из разных природных источников (пресной и морской воды, почвы, донных отложений) (R.M. Maier, 2003).

Табл.1.

Классификация биосурфактантов по строению и
продуцентам (Desai and Banat,1997).

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| Тип биосурфактанта | <i>Микроорганизмы</i> продуценты |
|--------------------|----------------------------------|

| | | | | |
|-------------------|-------------|---|---|---|
| НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ | Гликолипиды | Рамнолипиды | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> | |
| | | Трегалоллипиды | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> | |
| | | Софоролипиды | <i>Candida (Torulopsis) spp.</i> | |
| | | Маннозилэритритол -липиды | <i>Pseudozyma</i> , <i>Ustilago</i> | |
| | Липопептиды | Орнитин- и серинсодержащие | <i>Flavobacterium</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> | |
| | | Сурфактин, грамицидин, полимиксин, лихенизин | <i>Bacillus spp.</i> | |
| | | Вискозин, путисолвин | <i>Pseudomonas spp.</i> | |
| | Прочие | Жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды | <i>Corynebacterium</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus spp.</i> | |
| | ПОЛИМЕРНЫЕ | — | Эмульсан | <i>Acinetobacter venetianus</i> (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>) |
| | | | Аласан | <i>Acinetobacter radioresistens</i> |
| Липосан | | | <i>Candida lipolytica</i> | |

1.1.1. Рамнолипиды

Рамнолипиды – одни из первых известных поверхностно-активных гликолипидов, первые сведения о них появились в 40-х годах в XX веке (Bergstrom S., Theorell H., Davide H., 1946; . Jarvis F. G., Johnson M. J., 1949). Представляют собой неразветвлённые β-гидроксилированные жирные кислоты и углеводы рамнопиранозы C₆H₁₂O₅ (6-дезоксид-*L*-маннозы) (Müller M. M., Haussmann R., 2011).

Наличие гликозидной связи между гидроксильной группой и сахаром является различием структурной особенностью этих соединений.

Различают монорамномонолипиды, дирамномонолипиды, монорамнодипиды и дирамнодипиды – это зависит от количества молекул углеводов и жирных кислот.

Продуцентами рамнолипидов являются микроорганизмы рода *Pseudomonas*, наиболее изученным является *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud A. M., Lepine F., Deziel E., 2010). Физико-химические свойства: повышение нефтеотдачи, использование в процессах биоремедиации (комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием биологических объектов – грибов, растений, насекомых и других организмов), применение как компоненты моющих средств, а также в фармацевтике и косметологии (Abalos A., Pinazo A., et al., 2001; Nguyen T. T., Youssef N. H., Mcinerney M. J., Sabatini D. A., 2008; Darvishi P., Ayatollahi S. et al., 2011). Рамнолипиды используются как ингибиторы роста бактерий и образования биопленок патогенами. Обладают антибактериальной активностью в отношении многих микроорганизмов, таких как *S.aureus*, *Mycobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Kl. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *S. marsecens* и грибов *Chaetomium globosum*, *Aureobacidium pullulans*, *Bothryhs cinerea*. Также рамнолипиды эффективны в биопленкообразующих отношениях бактериальных и грибковых видов, например, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus pumilus* и *Yarrowia lipolytica* (Irie Y, O'Toole GA, Yuk MH., 2005; Dusane DH, Nancharaiah YV, Zinjarde SS, Venugopalan VP, 2010; Dusane DH, Dam S, Nancharaiah Y V., et al, 2012). Рамнолипиды синтезируются из отходов других производств или возобновляемых ресурсов, то есть являются нетоксичными и биоразлагаемыми (Marsudi S., Unno H., Hori K., 2008; Wei Y.-H., Chou C.-L., Chang J.-S.).

Помимо рамнолипидов к гликолипидам входят: софоролипиды, маннозилэритоллипиды, трегалолипиды, которые в свою очередь представляют особое значение для изучения (Jacques, P., 2011).

1.1.2 Трегалолипиды

Трегалолипиды – это вещества, у которых высокая эмульгирующая активность и действенное снижение поверхностного натяжения среды. Их используют в биотехнологиях защиты окружающей среды и в технологиях добычи нефти (повышение нефтеотдачи) (Liu C.W., Liu H.S., 2011; Pacheco G.J., Ciapina E.M., Gomes E. V.). Также они проявляют биологическую активность при контакте с фосфолипидными мембранами и белками, гемолитическую активность, влияют на дифференциацию опухолевых клеток человека, таким образом, трегалолипиды имеют потенциал в сфере медицины (Ortiz A., et. al; Zaragoza A., et. Al.; 2010).

Трегалолипиды содержат невосстанавливающий дисахарид трегалозу $C_{12}H_{22}O_{11}$ (α -D-глюкопиранозил-1,1- α -D-глюкопираноза), которые соединены с жирными кислотами сложноэфирной связью (Lang and Philp, 1998).

Микроорганизмы семейства актинобактерий родов *Mycobacterium*, *Norcadia*, *Anthrobacter*, *Gordonia* и *Rhodococcus* способны синтезировать трегалолипиды (Asselineau and Asselineau, 1978). Эндотип (клеточно-связанные) трегало-6,6'-димиколаты, то есть «корд-фактор», являются фактором патогенности туберкулёзных бактерий *Mycobacterium tuberculosis*. На сегодняшний день наиболее изученными являются родококки. В 1979 году был описан штамм *R. erythropolis* DSM43215, который синтезирует поверхностно-активные вещества в условиях роста на 2% среде C_{12} - C_{18} *n*-алканов (Rapp et al., 1979). А в 80-х годах XX в. исследовано способность трегалолипидов снижать межфазное натяжение между водными растворами солей и гексадекан (Kretschmer et al., 1982). Биосурфактанты экзо- и эндотипов образовались на гексадекане при росте штамма *Rhodococcus* sp. H13-A, содержащие в себе неионогенные липиды трегалозы с одной основной и несколькими минорными элементами. Основной компонент – 2,3,4,6,2',3',4',6'-октаалканоилтрегалоза, минорные – ди-, тетра-, и октаацилированные производные углевода.

Далее был изолирован штамм *Rhodococcus* sp. 51T7, который синтезирует гликолипиды и используют их в повышении нефтедобычи (Espuny et al., 1996; Kim et al., 1990). Из этого штамма при росте на отходах машинного нефтепродукта отбирали 2,3,4,2'-тетраэфиры трегалозы, у которых в соединении обнаружен сукциноил. При росте на глицерине или гексадекане микроорганизмы штамма *Rhodococcus* sp. SD-74 образовывали два либо один остаток янтарной кислоты или два анионных трегалолипида, которые содержат два жирнокислотных остатка (Uchida et al., 1989; Tokumoto et al., 2009).

1.1.3. Софоролипиды

Софоролипиды содержат дисахарид софорозу соединенный с предпоследним атомом углеродной цепи жирной кислоты C₁₆-C₁₉ гликозидной связью, синтезируются преимущественно дрожжами родов *Candida* и *Torulopsis* (Mulligan C. N., 2005; Hu Y., Ju L. K., 2001). Софоролипиды сводят к минимуму поверхностное натяжение и не действенны как вещества, которые обеспечивают образование эмульсий из несмешивающихся растворов.

Впервые были описаны в 70-80гг. XX в. (Cutler A. J., Light R. J., 1979; Ito S., Inoue S., 1982). Софоролипиды используют в качестве эффективного антиадгезивного агента и как препарат для очистки окружающей среды от ксенобиотиков (Batista et al., 2010; Luna et al., 2011). Благодаря свойствам высокого эмульгирования поверхностно-активных веществ *Candida tropicalis* USP0996 эффективно очищали песок от нефти и моторного масла в виде супенатанта культуральной жидкости. Также возможен синтез ПАВ руфисана штаммом *Candida lipolytica* UCP0988 на отходах производства соевого масла. Руфисан проявляет антимикробное действие в отношении представителей рода *Streptococcus* и менее активно действовал на представителей рода *Lactobacillus*, а также не ингибировал рост у *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. epidermidis*. Лунасан, синтезированный *C. sphaerica* UCP0995 на среде с соевым маслом, оказался действенным антиадгезивным и антимикробным агентом (Sarubbo L. A., Luna J. M.

et al.). Наиболее эффективно действовали на представителей рода *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Candida*.

Продуцентами софоролипидов являются не только штаммы рода *Candida*, но и штаммы термотолерантных дрожжей *Pichia anomala* PY1, которые способны синтезировать поверхностно-активные вещества софоролипидной природы (Thaniyavarn et al., 2008).

1.1.4. Маннозилэритритоллипиды

Основная структура маннозилэритритоллипида содержит 4-О- β -D-маннопиранозил-*мезо*-эритритол, который соединен с жирной кислотой или ацетильными группами. Представители рода *Pseudozyma* являются основными продуцентами (Т.П.Пирог, А.Д.Конон, 2014). В частности, показано стимулирующее влияние маннозилэритритоллипидов на процессы эмульгирования и биodeградации алканов.

1.1.5. Липопептиды и липопротеины

Липопептидные биосурфактанты предполагают собой циклические соединения, и они в ведущем удалены из микробов наподобие *Bacillus* и *Pseudomonas*. Липопептиды экологически чистые, низко токсичные, неопасные и биоразлагаемые, проявляют пенообразующие свойства и высокую селективность, чем синтетические аналоги. Липопептиды состоят из гидрофильных пептидов, как правило, они длиной из 7 и 10 аминокислот, которые связаны с гидрофобной структурой жирных кислот. (Kakinuma A. et al., 1969).

Основными липопептидами являются: сурфактин, итурин, полимиксины, фенгицин, путисолвин и сурлактин. Рост грамотрицательных бактерий подавляет полимиксины; противогрибковой активностью против нитчатых грибов обладают фенгицин и итурин; сурфактин обладает противомикробной активностью и поверхностно-активными свойствами (Meena KR, Kanwar SS, 2015). А сурлактин и

путисолвин проявляют дисперсионную и антиадгезионную активность в формировании биопленок *Pseudomonas aeruginosa* (Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, et al, 2004 ; Munira IC, Kadhim IM, Maysaa A-МК, 2013).

Активность липопептидов зависит от их структурных компонентов, к примеру, на подобии гидрофильных и гидрофобных групп и их пространственной ориентации (Ron et al., 2001; Noha et al., 2005). Маленькие конфигурации, в том числе и на уровне одной аминокислоты, имеют все шансы оказать важное воздействие на общее поведение молекулы в связи с изменениями гидрофильно-гидрофобного баланса. Например, изменение в сурфактине аминокислоты в положениях 2,4 и (или) 7 на более гидрофобные остатки приводит к увеличению поверхностной активности и снижению критической концентрации мицеллообразования. Не считая этого, липопептиды имеют все шансы преобразовывать бактериальную гидрофобность. Было высказано предположение, что липопептиды могут адсорбироваться на поверхности клеток благодаря тому, что циклический пептид (гидрофильные) или жирные кислоты на конце хвоста (гидрофобные) изменяют поверхностные свойства в сторону усиления гидрофильности или гидрофобности в ответ на конкретные условия среды (Ahimou et al., 2000).

Фенгицин – циклический липодекапептид, содержащий β -гидроксикислоту с 16-19 атомами углерода в боковой цепи. Также содержит 10 аминокислот, из которых 8 находятся в циклической структуре. Фенгицин проявляет активность в отношении нитчатых грибов, подавляет такие ферменты как фосфолипаза и ароматаза (Steller S., Vater J., 2000). Проявляются фенгицины в смеси изоформ, которые изменяются по длине и по разветвлению фрагмента β -гидроксикислоты, может отличаться аминокислотный состав пептидного кольца (Loeffler W. et al., 1986)

Итурины – считаются гептапептидами, которые предполагают собой группу полипептидных антибиотиков. Состоят из 7 α -аминокислот, которые включают в

себя β -аминомасляную кислоту. Итурины оказывают противогрибковую активность (Thimon L. et al, 1995; Tsuge K., Akiyama T., Shoda M., 2001).

Сурфактин – представляет собой поверхностно-активное вещество, который применяется как антибиотик. Состоит из пептидной петли из 7 аминокислот (L – аспаргиновая кислота, два L – лейцина, L – валин, глутаминовая кислота, и два D – лейцина) (Kakinuma A. et al., 1969). Небольшой полярный домен составляют остатки аспаргиновой и глутаминовой кислот в положениях 1 и 5, а гидрофобный домен – остаток валина в положении 4.

Сурфактин неспецифичен и поэтому действует на многие виды мембран. Проявляет такие свойства как: антибактериальная, противовирусная и противогрибковая активность.

Полимиксины – группа полипептидных антибиотиков, выделенные из *Raenibacillus polymyxa* в 1947 г. (Storm D. R., Rosenthal K. S., Swanson P. E. 1977). Представляют собой 10 аминокислотных остатков, 6 из которых это L- α , γ -диаминомасляную кислоту. Циклический компонент образуют семь аминокислотных остатков и три – линейный трипептид.

Полимиксины содержат пять основных соединений – полимиксин А, В, С, D, Е. Отличие только в аминокислотных последовательностях и боковых цепях жирных кислот. Полимиксин В и полимиксин Е – основные полимиксины, так как используются чаще всех. Их отличие в том, что полимиксин Е содержит D-лейцин, а полимиксин В фенилаланин в 6 положении (Landman D. et al., 2008).

Липопептиды были охарактеризованы и идентифицированы с помощью ТСХ, ВЭЖХ, методом секвенирования, а также ПЦР.

1.1.6. Жирные кислоты, фосфолипиды и нейтральные липиды.

Некоторые бактерии и дрожжи выделяют в среду поверхностно-активные жирные кислоты и фосфолипиды в присутствии *n*-алканов с образованием

микроэмульсий (Kosaric et al., 1993; Jitendra and Banat, 1997). *Acinetobacter sp.* и *R. erythropolis* в среде с гексадеканом образуют фосфотидилэтаноламин. Плесневые грибы *Aspergillus sp.* синтезируют фосфолипиды на среде с углеводородом (Kosaric, et al., 1993).

Внеклеточные свободные жирные кислоты также образуются микроорганизмами при росте на средах с алканами. Выраженную поверхностную активность проявляют насыщенные жирные кислоты и жирные кислоты, которые содержат гидроксильные группы и алкильные боковые заместители (Kosaric, et al., 1993).

1.2. Род *Bacillus*.

Род *Bacillus* изучается во многих отраслях, таких как пищевая промышленность, биотехнологии и генной инженерии, также интересны в экологических исследованиях. (А. В. Садунова, 1976). В 1872 году впервые введено родовое название *Bacillus* для палочковидных микроорганизмов Фердинандом Юлиусом Коном. Клетки микроорганизма рода *Bacillus*, семейства *Bacillaceae* – палочковидные, размером $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм, с обрубленными или закругленными концами, часто в парах или цепочках (А.В. Душкин, А.П. Лыков, О.Н. Ларина, 2011).

На 01.01.1980г. род *Bacillus* включал в себя 31 вид – это говорит о динамичности рода. Также род *Bacillus* был подвергнут реклассификации. Дифференциация базировалась на способности к анаэробному росту, форме клетки, споры, расти на средах с 10% раствором NaCl, в составе жирных кислот (E.Stackebrandt, M. Dworkin et al., 2006).

На данный момент род *Bacillus* содержит 77 видов, в которых объединены грамположительные строго аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, подвижные из-за перетрихиальных жгутиков, способные выдержать высокую температуру эндоспоры (овальной или сферической, возможно

цилиндрической формы), которые устойчивы к неблагоприятным химическим и физическим влияниям (В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин, 2007).

Микроорганизмы этого рода обширно распространены в окружающей среде и встречаются везде – в биосфере, почве, морях и океанах, в пищевых продуктах, в организме животных, насекомых и человека. Также этот штамм обнаружен у растений: семенах, корнях, стеблях (Батаева Ю.В., Магзанова Д.К., и др., 2015).

Такие ферменты как: трансфераза, липаза, гидролаза, жиры, пектины, белки, целлюлоза для регулирования и стимулирования процессов пищеварения, а также большое разнообразие антибиотиков, витаминов и аминокислот продуцируют не патогенные аэробные микроорганизмы рода *Bacillus* (Соколенко Г.Г., Лазарев Б.П., Миньченко С.В., 2015).

Также микроорганизмы рода *Bacillus* способны произвести синтез фитогормонов – гиббереллины, ауксины, этилен, цитокинины (Timmusk S., Nicander B., Granhall U., Tillberg E., 1999).

1.2.1. Род *Bacillus* в образовании биосурфактантов.

Многие штаммы рода *Bacillus* проявляют способность секретировать различные биологические активные соединения (липopeптиды, белки, пептиды), которые имеют сильное коммерческое значение (Jacques, P., 2011). Также они в морской среде продуцируют широкий спектр противомикробных и фунгицидных соединений (Narendrakumar L, Das B, Paramasivan B, et al., 2018). Такие штаммы как *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus* обладают потенциалом для производства вторичных метаболитов, особенно циклических липopeптидов, которые полезны в сельском хозяйстве, фармацевтике и биотехнологии (Sarwar A, Brader G, Corretto E, et al., 2018). Вторичные метаболиты липopeптидов разделены на три семейства: сурфактины, фенгицины (пипастатины) и итурины (например, итурин, микосубтилин и бацилломицин), которые отличаются между собой длиной и разветвленностью боковых цепей жирных кислот и аминокислотными заменами в

пептидном кольце (Jacques P., 2011; Ongena M, Jacques P., 2008). Первым известным изолятом биосурфактантов был сурфактин, продуцируемый *B. subtilis* (Arima K, Kakinuma A, Tamura G., 1968). Точная структура была установлена в качестве циклического липопептида с β -гидрокси жирной кислотой как гидрофобный фрагмент, связанный со специфической последовательностью из 7 α -аминокислот, L-Glu – L-Leu – L-Leu – L-Val – L-Asp – L-Leu – L-Leu – амидной группой и лактонной связью (Huszczka E, Burczyk B., 2006). Фенгицин представляет собой циклический декапептид с β -гидрокси жирной кислотой в боковой цепи, а итурин – циклический пептид из 7 аминокислот (гептапептиды), который связан с цепью жирной кислоты (β -амино) (Ongena M, Jacques P., 2008; Wu CY, Chen CL, Lee YH, et al., 2007).

Штамм *Bacillus altitudinis* является грамположительной аэробной бактерией в форме палочки, который классифицирован в типе *Firmicutes*. Известно, что он был изолирован от образцов воздуха, которые подвергались воздействию ультрафиолетового напряжения, собранных в стратосфере (Shivaji S, Chaturvedi P, et al., 2006). Таким образом *B. altitudinis* зарегистрирован в разнообразных местообитаниях, также в южной части Индийского океана, в глубокой пресной воде озера Манасбал, почве и иле (Shafi S, Kamili AN, et al., 2017; Vijay Kumar E, Srijana M, et al., 2011).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Работа была выполнена на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии (БГМУ).

В качестве объекта исследования использовался штамм *Bacillus altitudinis*.

2.1. Приготовление питательных сред для культивирования штамма *Bacillus altitudinis*.

Для выделения чистой культуры *B. altitudinis* использовали жидкую тиогликолевую среду и кровяной агар.

Состав (г/л): гидролизат казеина – 15,00; дрожжевой экстракт – 5,00; глюкоза – 5,50; NaCl – 2,50; L-цистин – 0,50; натрия тиогликолят – 0,50; резазурин – 0,001; агар-агар – 0,75.

Приготовление: В 1 л дистиллированной воды размешали 29,75 г порошка M009. Далее нагревали до полного растворения и автоклавировали при 121 °С в течение 15 мин. Остудили до 25 °С.

Состав кровяного агара (г/л): настой говяжьего сердца – 500,00; триптоза – 10,00; NaCl – 5,00; агар-агар – 15,00.

Способ приготовления: В 1000 мл дистиллированной воды размешали 40,0 г порошка. Прокипятили до растворения частиц. В течение 15 мин при 121 °С автоклавировали. После того как остудили до 50 °С добавили до 5% дефибринированную кровь. Перемешали и разлили в чашки Петри.

2.2. Методы посева бактерий

Посев культуры бактериологической петлём методом истощающего штриха: накопительную культуру отбирают петлём и на поверхность плотной среды проводят штрихи по площади первого сектора, далее второго, третьего и т.д. Перед каждым новым штрихом бактериальную петлю стерилизуют в пламени горелки

(Нетрусов и др., 2005). Чашки помещают в термостат и через определенное время проводят визуальный анализ посевов (Нетрусов и др., 2005).

Для оживления штамма во флакон добавили жидкую тиогликолевую среду и инкубировали 24 ч. в термостате при 37 °С и далее проводили визуальный анализ посевов (Рис.1).



Рис.1 Рост культуры *B. altitudinis* на агаризированной среде.

Посевы газоном производили на плотную питательную среду в чашке Петри по методу Дригальского, приоткрыв крышку, вносили посевной материал на поверхность питательной среды. Тщательно втирали посевной материал круговыми движениями. в пламени горелки (Нетрусов и др., 2005).



Рис.2 Посев штамма *B. altitudinis* на кровяном агаре

2.3. Рост штамма *Bacillus altitudinis* в жидкой среде

Для получения биомассы штамма *Bacillus altitudinis* заседали в колбы, в которые внесли по 100 мл среды LB, антибиотики по 100 мкл:

Первая колба – среда LB + чистая культура *Bacillus altitudinis*

Вторая – среда LB + ампициллин + чистая культура *Bacillus altitudinis*

Третья – среда LB + тетрациклин + чистая культура *Bacillus altitudinis*

Четвертая - среда LB + хлорамфеникол + чистая культура *Bacillus altitudinis*

Посевы инкубировали в термостатированном шейкере 18-20 часов. После инкубирования из каждой колбы взяли по 1000 мкл, для выделения ДНК. Культуральную жидкость использовали для изучения эмульгирующей активности.

По этой же схеме проводили культивирование *Bacillus altitudinis* на синтетических средах с добавлением производных фенольной природы.

2.4. Выделение препаратов ДНК

Препараты ДНК выделяли способом, описанным Llor P (Llor P, Caruso P, Cubero J, Morente C, López MM, 1999). 1 мл бактериальной суспензии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера для экстракции (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP). После 1 ч. встряхивания, пробирки центрифугируем в течение 5 мин при 5000 об/мин. В новые пробирки переносили 450 мкл, в которые далее добавляли 450 мкл изопропанола. Проводили осаждение в течении 1 часа, после этого центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК высушивали и ресуспендировали в 200 мкл дистиллированной воды.

2.5. Выделение ДНК с помощью Chelex.

В пробирку внесли 200 мкл Chelex и 50 мкл исследуемого образца. Ресуспендировали и поместили в термостат на 10 мин при температуре 95°C. Перемешали на вортексе. При 12 000 об/мин в течение 5 мин центрифугировали.

2.6. Определение антибиотикоустойчивости

Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) определяют диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»), который основан на диффузии АБП из носителя в плотную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК. Для определения чувствительности ДДМ используют такую же питательную среду, как и для метода разведения в агаре (Нетрусов и др., 2005).

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм суточной культуры микроорганизмов, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно $1,5 \cdot 10$ КОЕ/мл. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм. Таким образом, на

одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с АБП. Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Для учета результатов определяют диаметр зоны задержки роста микроорганизма вокруг дисков, используя для этого миллиметровую бумагу. Отсутствие задержки роста бактерий указывает на резистентность данного микроорганизма к данному антибиотику. Зоны, диаметр которых не превышает 15 мм, свидетельствуют о слабой чувствительности к антибиотику, зоны от 15 до 25 мм встречаются у чувствительных микроорганизмов и зоне задержки более 25 мм у высокочувствительных бактерий (Нетрусов и др., 2005).

2.7. Определение устойчивости *Bacillus altitudinis* к антибиотикам (ампициллин, тетрациклин и хлорамфеникол) методом ПЦР

Полимеразная цепная реакция была описана американским ученым Кэри Мюллисом в 1983-1984 гг. В основе ПЦР лежит естественный для клеток процесс репликации (процесс удвоения молекулы ДНК). ПЦР проводится в реакционной смеси содержащей: праймеры, Taq-полимеразу, смесь dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфат), буфер, деионизованную воду и анализируемый образец.

Процесс амплификации включает несколько циклов, состоящих из трех этапов:

1. Денатурация – процесс разрушения водородных связей между двумя цепями ДНК в результате которого происходит переход ДНК из двухнитевой в однонитевую форму. Нагревают дцДНК до 94 – 96 °С на 0,5-2мин.

2. Отжиг – производится при снижении температуры для того, чтобы праймеры присоединились к оцДНК-мишени. Праймеры подбираются к определенному участку ДНК по принципу комплементарности. При отжиге

реакционную смесь охлаждают примерно до 55 °С. Если температура подобрана неправильно, то праймеры могут плохо связаться с матрицей, а также возможно появление неспецифических продуктов.

3. Элонгация – достраивание второй цепи ДНК. Таq-полимераза при 72 °С начинает репликацию второй цепи от 3'-конца праймера с использованием dNTP.

Циклический процесс амплификации повторяется многократно (30 и более). Количество реплицированных копий ДНК удваивается на каждом цикле.

Табл.2.

Параметры программы амплификации ДНК

| | Температура | Время | Количество циклов |
|-----------------------|-------------|--------|-------------------|
| Начальная денатурация | 95 °С | 3 мин | 1 |
| Денатурация | 94 °С | 1 мин | 35 |
| Отжиг | 60 °С | 30 с | |
| Элонгация | 70 °С | 45 с | |
| Финальное удлинение | 70 °С | 10 мин | 1 |

Для обнаружения генов, обуславливающих устойчивость к антибиотикам, ампициллину (Amp), тетрациклину (Tc) и гена *cat* – к хлорамфениколу (Cm), проводили ПЦР с использованием стандартных праймеров (Ерошенко Г.А. и др., 2011).

2.8. Детекция генов сурфактантов у *Bacillus altitudinis* методом ПЦР

Для обнаружения генов сурфактантов у *Bacillus altitudinis* методом ПЦР были подобраны праймеры генов сурфактина, фенгицина, итурина (Табл.3.)

Табл.3.

Праймеры, использованные для скрининга входящих в биосинтез липопептидов методом ПЦР (Chung et al., 2008)

| | Ген | Последовательность праймеров | Размер (bp) | Темп. Отжига (°C) |
|-----------|--------------|---|-------------|-------------------|
| Surfactin | <i>sfp</i> | F-5' ATGAAGATTTACGGAATTTA 3' R-5' TTATAAAAGCTCTTCGTACG 3' | 675 | 50 |
| | <i>srfAA</i> | F-5' TCGGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5' CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3' | 201 | 60 |
| Fengycin | <i>fenB</i> | F-5' CCTGGAGAAAGAATATACCGTACCY 3' R-5' GCTGGTTCAGTT KGATCACAT 3' | 670 | 57 |
| | <i>fenD</i> | F-5' GGCCCGTTCTCTAAATCCAT 3' F-5' GTCATGCTGACGAGAGCAAA 3' | 269 | 60 |
| Iturin A | <i>ituD</i> | F-5' TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT 3' R-5' TGCGMAAATAATGGSGTCGT 3' | 482 | 57 |

Проведение ПЦР.

Ход работы:

1. Для разморозки в штативе расположить пробирки с растворами dNTP, праймеров, Taq-полимеразы. Осторожно перемешать на вортексе.
2. Взять необходимое количество стерильных пробирок с выгнутой крышкой объемом 0,2 мл, сделать маркировку и расставить в штативе.
3. Приготовить смесь для проведения ПЦР (рассчитано на 1 пробирку): реакционная смесь – 10 мкл, mQ – 9 мкл, праймер – по 2 мкл, исследуемый образец – 3 мкл (используя для каждой пробирки отдельный наконечник с фильтром).

2.9. Измерение эмульгирующей активности.

Активность эмульгирования измеряли по методике Rosenberg, а также методом Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987). В мерные пробирки с притертыми пробками объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл исследуемой жидкости. Содержимое пробирок перемешали на вортексе на максимальной скорости в течение 2 мин. Спустя 24 ч после проведения

эксперимента рассчитывали индекс эмульгирования, как отношение объёма плотной эмульсии, которая образуется при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму раствора, умноженное на 100%:

$$E_{24} = V_3 / V * 100\%, \text{ где}$$

E_{24} – индекс эмульгирования, %;

V_3 – объём плотной эмульсии, мл;

V – общий объём раствора, мл.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологические и тинкториальные характеристики чистой культуры.

Для проверки морфологических и тинкториальных признаков был произведен посев изучаемых бактерий на кровяной агар (Рис.3).

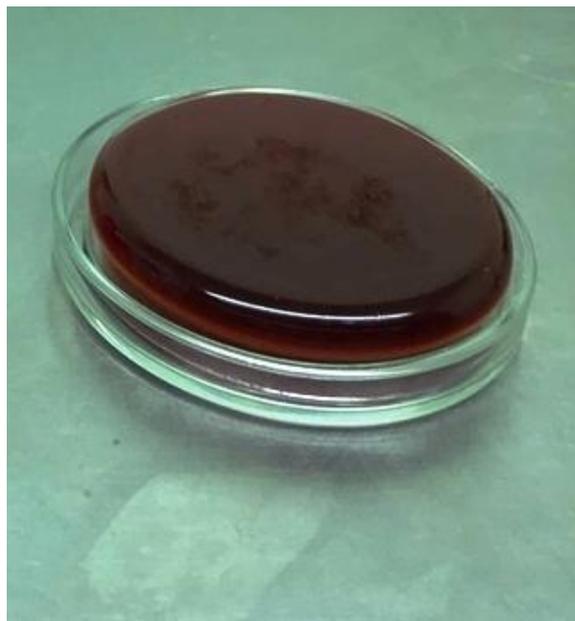


Рис.3. Рост бактерий на кровяном агаре в чашке Петри.

По истечении инкубации в чашке Петри наблюдался рост отдельных колоний, которые были подвергнуты дальнейшему анализу. При культурально-морфологическом исследовании колонии обнаружили следующие характеристики:

Форма – округлая

Размер – 2-3мм

Поверхность – гладкая

Профиль – выпуклый

Цвет – молочный

Край – ровный

Структура – среднезернистая

Сравнение наблюдаемых признаков показало существенное сходство с культурально – морфологическими характеристиками, описанными для представителей рода *Bacillus* (Рис.4)

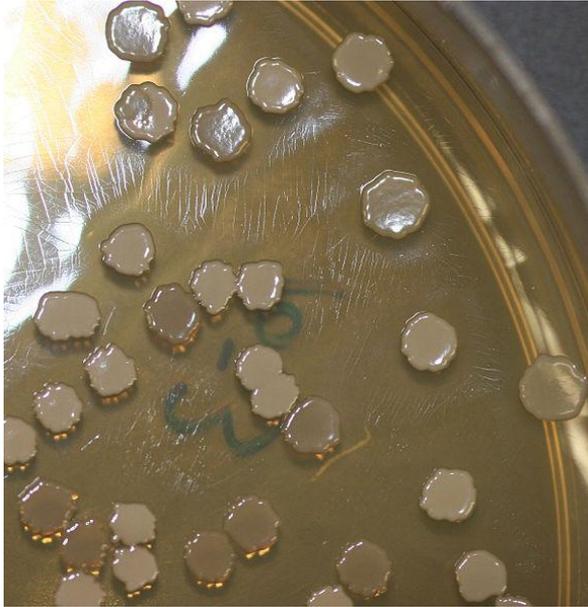


Рис.4. Изолированные колонии *Bacillus* (Источник: <https://ru.qwe.wiki/wiki/Bacillus>).

3.2. Физиолого – биохимические признаки *B. altitudinis*

При исследовании физиолого – биохимических признаков требуется изучение продуктов жизнедеятельности, накапливаемых в среде (кислоты, спирты, газы); ферментативной активности. Для этого исследуемая культура была сначала посеяна в жидкую тиогликолевую среду и кровяной агар (Рис.5).



Рис.5. Посев на жидкую тиогликолевую среду и кровяной агар.

Штамм показал следующие характеристики: аэробный рост, положительный эффект на каталазу, оксидазу, β -галактозидазу и амилазу; отрицательное влияние на снижение производства нитратов до нитритов и индолов; положительную активность лизиндекарбоксилазы и фенилаланиндезаминазы; толерантность к 2% NaCl; рост между pH 6 и pH 8; рост от 20 до 40 °C; рост на пептонном агаре; неспособность использовать лимонную кислоту, ацетат натрия.

Табл.4. Биохимические свойства *B.altitudinis*

| Характеристика: | <i>B.altitudinis</i> |
|----------------------------|----------------------|
| рН 5 | + |
| 45 °С | + |
| Гидролиз: | |
| казеин | 2 |
| желатин | + |
| крахмал | + |
| Утилизация цитрата | 2 |
| Липаза | 2 |
| Разложение тирозина | + |
| Использование аминокислот: | |
| L-глицин | + |
| L-Тирозин | + |
| | |

Методами микроскопии было подтверждено, что клетки изучаемых бактерий имеют палочковидную форму, подвижные, грамположительные.

3.3. Подбор праймеров для молекулярно-генетического анализа.

Подбор праймеров является ключевым элементом при исследовании определенных фрагментов гена методом ПЦР. Для выявления продукции сурфактина *Bacillus spp.* использовали ПЦР гена *sfp* (Hsieh et al., 2004).

Для того чтобы найти определенную последовательность генов использовали биоинформационную базу данных NCBI. National Center for Biotechnological Information – является национальным центром биотехнологической информации, который предоставляет сведения о строении генома живых организмов – о последовательностях нуклеотидов и аминокислот.

Синтез сурфактина.

Ген *srfAA*, ответственный за синтез сурфактина состоит из 4 открытых рамок считывания. Первые три рамки считывания *srfAA* (402 кДа), *srfAB* (401 кДа) и *sr-JAC* (144 кДа) кодируют субъединицы нерибосомной пептид-синтетазы, которые удлиняют олигопептидную цепь (Kraas et al, 2010). Ген *sfp* находится ниже на 4 кб от оперона *srfA* и отвечает за посттрансляцию фосфопантетеинилирование доменов РСР для превращения из неактивной апоформы в активную галоформу ((Das et al., 2008; Reuter et al., 1999; Roongsawang et al., 2010; Wu et al., 2017)). Четвертый ген *srfAD* (4 кДа) не участвует в удлинении пептидной цепи, а синтезирует II типа тиоэстеразу у которого функция рециркуляция доменов несоответствующих пептидных белков-носителей (РСР) (Koglin et al., 2008).

Синтез фенгицина.

Биосинтез фенгицина кодируется 5 открытыми рамками считывания и присоединением β -гидрокси жирной кислоты к первой аминокислоте в FenC. Другими открытыми рамками считывания, которые кодируют фенгицин являются *fenC* (*ppsA*) (287 кДа), *fenD* (*ppsB*) (290 кДа), *fenE* (*ppsC*) (286 кДа), *fenA* (*ppsD*) (406 кДа) и *fenB* (*ppsE*) (146 кДа) (Tapi et al., 2010; Wu et al., 2007). Каждый из FenC, FenD и FenE присоединяет две аминокислоты к олигопептидной цепи, тогда как FenA и FenB присоединяют три или одну аминокислоту (Ongena and Jacques, 2008, Wu et al, 2007).

Синтез итурина.

Биосинтез итурина отличается от синтеза фенгицина и сурфактина. Все опероны биосинтеза состоят из четырех открытых рамок считывания: *ituD*, *ituA*, *ituB*, и *ituC*.

Табл.5.

Ключевые гены опероны нерибосомной пептид-синтетазы.

| Метаболит | Свойства метаболита | Оперон | Ген |
|-----------|--|---------------|-------------|
| Сурфактин | Сдерживает образование биопленок, ПАВ, ингибитор роста грибов. | <i>SrfA-D</i> | <i>srfA</i> |
| Фенгицин | Подавляет работу стеролов, фосфолипидов, олеиновых кислот. | <i>fenA-E</i> | <i>fenC</i> |
| Итурин | Фунгицид, который разрушает клеточную стенку. | <i>ituA-D</i> | <i>ituA</i> |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосурфактанты – продуцируемые микроорганизмами поверхностно-активные вещества (ПАВ), по химическому строению представляющие собой амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной (кислоты, моно-, ди- и полисахариды, пептиды) и гидрофобной частей (насыщенные и ненасыщенные углеводорода, жирные кислоты), которые снижают поверхностное и межфазное натяжение, что является причиной взаимосвязи с поверхностями различных полярностей (Ron E., Rosenberg E., 2001).

В настоящее время поиск и изучение микроорганизмов, способных к синтезу биосурфактантов, имеет большое значение, т.к. биосурфактанты обладают рядом преимуществ над синтетическими поверхностно-активными веществами: высоким биоразложением (Lima et al., 2011), низкой вирулентностью, высокой биологической совместимостью (Desai and Banat, 1997; Gautam and Tyagi, 2006), высокой активностью при экстремальных условиях температуры, pH, солёности (Abouseoud et al., 2008), структурным и функциональным разнообразием (Desai and Banat, 1997),

При исследовании новых штаммов важной задачей является получение данных как об их физиолого-биохимических особенностях, так и о характере синтезируемых ими поверхностно-активных веществ.

В задачи настоящей работы входило выявление особенностей штамма *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019. Выявлены следующие характеристики штамма: аэробный рост между pH 6 и pH 8 в диапазоне от 20 до 40 °С. Штамм *B.altitudinis* ap1 – 2019 образует колонии молочного цвета, выпуклые, гладкие, с ровным краем, средних размеров. Установлены тинкториальные свойства (грамположительные палочки).

Подобраны методики изучения синтеза поверхностно-активных веществ *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019, в частности, методики определения активности эмульгирования Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987).

Для молекулярно-генетического анализа *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019 проведен подбор праймеров генов, контролирующих синтез сурфактантов. Данный этап является ключевым элементом при исследовании определенных фрагментов целевых генов методом ПЦР. Для выявления продукции сурфактина подобраны праймеры гена *surfA* (Hsieh et al., 2004), ответственного за синтез сурфактина. С использованием биоинформационной базы данных NCBI подобраны наборы праймеров генов фенгицина (*fenC*) и итурина (*ituA*).

Следует отметить, что в ближайшей перспективе биосурфактанты будут иметь все более широкое применение в медицине, так как они могут влиять на дифференцировку клеток, вызывают распад биопленок и проявляют антиадгезионную активность (Balan SS, Mani P, Kumar CG, Jaylakshmi S., 2019), показан иммуномодулирующий эффект и противоопухолевая активность соединений данной группы. Кроме этого, микробные сурфактанты обладают противогрибковой и противовирусной активностью, способны проявлять противовоспалительные свойства, сдерживая рост патогенов, в том числе, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

ВЫВОДЫ

1. Описаны культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки штамма *B.altitudinis* ap1 – 2019 - колонии молочного цвета, выпуклые, гладкие, с ровным краем, средних размеров. Установлены тинкториальные свойства (грамположительные палочки).
2. По литературным данным установлено, что штаммы *B.altitudinis* обладают чувствительностью к антибиотикам, в частности, к тетрациклину и ампициллину.
3. Подобраны методики изучения синтеза поверхностно-активных веществ *Bacillus altitudinis* ap1 – 2019, в частности, методики определения активности эмульгирования Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987).

4. С использованием биоинформационной базы данных NCBI подобраны наборы праймеров генов сурфактина (*srfA*), фенгицина (*fenC*) и итурина (*ituA*) для обнаружения генов сурфактантов у *Bacillus altitudinis* api – 2019 методом ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андриянов А.И., Празднова Е.В., Васильченко Н.Г., Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р.*Bacillus* и *Paenibacillus*// «Живые и биокосные системы». -2018.-№25; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-25/article-6>
2. Батаева Ю.В., Магзанова Д.К., Астафьева О.В., Фомина М.Д., Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2015,123 (1), 70-76.
3. Душкин А.В., Лыков А.П., Ларина О.Н., Фундаментальные исследования, 2011, 9, 234-237
4. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В., Виноградова Н.А., Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом ПЦР. Проблемы особо опасных инфекции, 2011, вып. 107, 53-57.
5. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В., Химическая и биологическая безопасность 2, 2007, 32-33.
6. Садунова А.В., Мос. Университет, Москва, 1976, 307 с.
7. Соколенко Г.Г., Миньченко С.В., Лазарев Б.П., Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания 1, 2015, 72-78.
8. Abalos A., Pinaza A., Casals M., Infante M., García F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir, 2001, 17 (5), 1367-1371.

9. Abdel – Mawgoud A.M., Deziel E., Lepine F. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Proc. Biochem.* 2010, 86 (5), 1323-1336.
10. Abouseoud M., Amrane A., Yataghene A., Maachi R. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 35. No 11. P. 1303-1308.
11. Ahimou F., Deleu M., Jacques P., Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity // *Enzyme Microb. Technol.* – 2000 – vol. 7. p. 749-754
12. Arima K., Tamura G., Kakinuma A. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, 31:488-494.
13. Asselineau C., Asselineau J. Trehalose – containing glycolipids // *Prog. Chem. Fats other Lipids.* 1978. V. 16. P. 59 – 99.
14. Balan S.S., Kumar C.G., Mani P., Jayalakshmi S. Structural characterization and biological evaluation of Staphylosan (dimannooleate), a new glycolipid surfactant produced by a marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS-5. *Enzyme Microb Technol.* 2019. 120:1-7.
15. Batista R. M., Sarubbo L.A., de Souza J.E., Rufino R.D., Luna J.M. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water. Environ. Res.* 2010, 82(5), 418–425.
16. Bergstrom S., Davide H., Theorell H. Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1946, V. 10, P. 165–166.

17. Cooper D.G., Goldenberg G.G. Surface-active agents from two *Bacillus species* // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – № 2. – P. 224-229.
18. Cutler A. J., Light R. J. Regulation of hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the levels of glucose and yeast extract in the growth medium. J. Biol. Chem. 1979, 254(6), 1944–1950.
19. Darvishi P., Mowla D., Ayatollahi S., Niazi A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. Coll. Surf. B. Biointerfaces. 2011, 84(2), 292–300.
20. Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential// Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. No 1. P. 47–64.
21. Dusane DH, Dam S, Nancharaiah Y V., et al. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. Aquat Biosyst. 2012. 8:1-7. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-17>
22. Dusane D.H, Zinjarde S.S, Nancharaiah Y.V, Venugopalan V.P; Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2010. 81:242-248, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.013>
23. Espuny M. J., Rodon I., Egido S., Mercadé M. E., Manresa A. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus sp.* 51T7, Biotechnol. Lett. 1996, V. 18, P. 521–526.
24. Gautam K.K., Tyagi V.K. Microbial Surfactants: A Review // J. Oleo. Sci. 2006. V. 55. No 4. P. 155-166.
25. Hu Y., Ju L. K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. Enz. Microb. Technol. Rev. 2001, 29(10), 593–601.
26. Hsieh F.C., Li M.C., Lin T.C., Kao S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species

based on PCR. *Curr Microbiol*, 2004, 49:186–191. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7>

27. Huszcza E., Burczyk B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2006. 61:727-733.

28. Irie Y., Yuk M.H., O'Toole G.A. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms, 2005, *FEMS Microbiol Lett* 250:237-243.

29. Ito S., Inoue S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol*. 1982, 43(6), 1278–1283.

30. Jacques P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus spp*. In *Biosurfactants: From Genes to Applications* ed. Soberon-Chavez, G. 2011. pp. 57–93. Berlin Heidelberg:Springer, Microbiology Monographs vol. 20.

31. Jarvis F. G., Johnson M. J. A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc*. 1949, 71(12), 4124–4126.

32. Jitendra D. Desai and Ibrahim M. Banat, *Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential // Microbiology and Molecular biology reviews*. -1997- p. 47-64.

33. Kakinuma A. et al. Determination of the location of lactone ring in surfactin // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1969. – T. 33. – №. 10. – C. 1523-1524.

34. Kim J. S., Lang S., Powalla M., Lünsdorf H., Wray V., Wagner F. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol*. 1990. 13(4), 257–266.

35. Kosaric N., *Biosurfactants: Production, Properties // Applications* Surfactant Science Series. 1993.vol. 48- 483 p.

36. Kretschmer A., Wagner F., Bock H. Chemical and physical characterization of interfacialactive lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44(4), 864–870.
37. Kuiper I., Pickford R., Lagendijk E.L., et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. 2004. *Mol Microbiol* 51:97-113.
38. Landman D. et al. Polymyxins revisited // *Clinical microbiology reviews.* – 2008. – T. 21. – №. 3. – C. 449-465
39. Lang S., Philp J.S. Surface-active lipids in rhodococci // *Ant. van Leeuwen.* 1998.V. 74. P. 59–70.
40. Lima T.M., Brandao F.D., Procopio L.C., Carvalho A.M., Totola M.R., Borges A.C. Biodegradability of bacterial surfactants // *Biodegradation.* 2011. V. 22.No 3. P. 585-592.
41. Liu C.W., Liu H.S. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed batch bioreactors // *Process Biochemistry.* 2011. V. 46, № 1. P. 202–209.
42. Llop P., Cubero J., Caruso P, Morente C., López M.M. (1999) A simple extraction method for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J Microbiol Meth* 37:23-31
43. Loeffler W. et al. Antifungal Effects of Bacillysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 A Comparison with Activities of Other Bacillus Antibiotics // *Journal of Phytopathology.* – 1986. – T. 115. – №. 3. – C. 204-213.
44. Luna J. M., Albuquerque C. D., Rufino R. D., Sarubbo L. A., Campos-Takaki G. M. Economic optimized medium for tensio-active agent production by

Candida sphaerica UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. Int. J.Mol. Sci. 2011, 12(4), 2463–2476.

45. Makkar R.S., Cameotra S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 428–434.

46. Maneerat S., Songklanakarin J. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources // Sci. Technol. 2005. V. 27. P. 675–683.

47. Marsudi S., Hori K., Unno H. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008, 78(6), 955–961.

48. Meena K.R., Kanwar S.S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. Biomed Res Int 2015:1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>

49. Mora I, Montesinos E, Cabrefiga J. Antimicrobial peptide genes in Bacillus strains from plant environments. Int Microbiol, 2011, 14:213–223. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>

50. 54. Müller M. M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011, 91(2), 251–264.

51. Mulligan C. N. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 2005. 133(2), 183–198.

52. Munira I.C., Maysaa A.-M.K., Kadhim I.M. The effect of surlactin produced by *Lactobacillus acidophilus* on eye infectious bacteria in rabbits. Baghdad Sci J. 2013. 10:133-143.

53. Nguyen T. T., McInerney M. J., Youssef N. H., Sabatini D. A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 2008, 42(6–7), 1735–1743.
54. Noha H. Y., Kathleen E. D. and Michael J. McInerney, Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity // *Applied and Environmental Microbiology*-2005- vol. 71- No. 12- p. 7690-7695.
55. Narendrakumar L, Das B, Paramasivan B, et al. Quorum quenching and biofilm inhibition: Alternative imminent strategies to control the disease cholera. *Biotechnol Appl Quor Sens Inhib.* 2018. 63-85. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_4
56. Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008. 16:115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
57. Ortiz A., Teruel J.A., Manresa A., Marques A., Aranda F.J., Espuny M.J. Interactions of a *Rhodococcus sp.* biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes // *Biochim Biophys Acta.* 2008. V. 1778, № 12. P. 2806–2813.
58. Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marques A., Manresa A., Aranda F. J. Effects of a bacterial trehalose lipid on phosphatidylglycerol membranes // *Biochim Biophys Acta.* V. 1808, № 8. P. 2067–2072.
59. Pacheco G.J., Gomes E. B., Ciapina E.M., Junior N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal // *Braz J Microbiol.* 2010. V. 3, № 41. P. 685–693.
60. Petrikov K., Pona-moreva O., Delegan Y., Puntus I., Surin A., Filonov A., Boronin A. Gly-colipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Bio-chemistry*, 2013, vol. 48, no. (5-6), pp. 931-935.

61. Plaza G, Rudnicka K, Chojniak J, et al. Detection of biosurfactants in *Bacillus species*: Genes and products identification J Appl Microbiol, 2015, [119:1023–1034. https://doi.org/10.1111/jam.12893](https://doi.org/10.1111/jam.12893)
62. Rapp P., Wray V., Bock H., Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. J. Gen. Microbiol. 2015. 115(2), 491–503.
63. Rodrigues L.R., Teixeira J.A. Biomedical and therapeutic applications of biosurfactants. Adv. Exp. Med. Biol., 2010, vol. 672, pp. 75-87.
64. Ron E., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // Environ Microbiol. 2011. V. 3, № 4. P. 229–236.
65. Rosenbeerg E. Biosurfactants. In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria 3rd ed. V. 1. [Ed. by Dworkin M. et al.]. New York, Springer Science+Business Media Inc., 2006. – P. 834-849.
66. Sakaguchi I., Kaneda K. Nakayama M., Ikeda N., Kato Y., Yano I.. Trehalose 6,6'- dimycolate (cord-factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages // Infect. Immunity. 2000. V. 68. No 4. P. 2043–2052.
67. Satpute S.K., Dhakephalkar P.K., Banpurkar A.G., Banat I.M., Chopade B.A.. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // Crit Rev Biotechnol. 2010. V. 30, № 2. P. 127–144.
68. Shafi S., Bandh S.A., Kamili A.N., Shah M.A., Dar R. 2017. Dynamics of bacterial class *Bacillis* in the deepest valley lake of Kashmir-the Manasbal Lake. Microb Pathog104:78–83. doi:10.1016/j.micpath.2017.01.018.
69. Sarwar A., Corretto E., Brader G., et al. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus species* exhibiting antifungal activity. PLoS One. 2018.13:1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>

70. Shivaji S., Chaturvedi P., Narlikar J.V., Reddy G.S., Dutt C.B., Wainwright M., Suresh K., Bhargava P.M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011. 56:1465–1473. <https://doi:10.1099/ijs.0.64029-0>
71. Singer M.E.V., Finnerty W.R. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus species* H13-A // *Can. J. Microbiol.* 1990. V. 36. P. 741-745.
72. Stackebrandt E., Falkow S., Dworkin M., *A Handbook on the Biology of Bacteria.* 2006. 3, 29-57.
73. Steller S., Vater J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* – 2000. – T. 737. – №. 1-2. – C. 267-275.
74. Storm D. R., Swanson P. E., Rosenthal K. S. Polymyxin and related peptide antibiotics // *Annual review of biochemistry.* – 1977. – T. 46. – №. 1. – C. 723-763.
75. Thaniyavarn J., Thaniyavarn S. Sangvanich P., Chianguthai T., Roongsawang N., Washio K., Morika wa M., Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72(8), 2061–2068.
76. Thimon L. et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells // *FEMS Microbiology Letters.* – 1995. – T. 128. – №. 2. – C. 101-106.
77. Timmusk S., Nicander B., Tillberg E., Granhall U. *Soil Biology and Biochemistry* 31. 2000. 847-1852.

78. Tokumoto Y., Fukuoka T., Uchiyama H., Imura T., Nomura N., Morita T., Kitamoto D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74 // J. Oleo Sci. 2009. V. 58. P. 97–102.
79. Tsuge K., Shoda M., Akiyama T. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon // Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 21. – C. 6265-6273.
80. Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // Agricul. Biol. Chem. 1989. V. 53. P. 757–763.
81. Vijay Kumar E., Harikrishna N., Srijana M., Kiran Kumar K., Reddy G. 2011. A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. Bioprocess Biosyst Eng 34:403–409. <https://doi:10.1007/s00449-010-0483-x>
82. Wei Y.-H., Chou C.-L., Chang J.-S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochem. Eng. J. 2004, 27(2), 146–154.
83. Wu C.Y., Lee Y.H., Chen C.L. et al. Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. J Biol Chem. 2007. 282:5608-5616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609726200>
84. Zaragoza A., Ortiz A., Espuny M. J., Teruel J.A., Aranda F. J., Marques A., Manresa A. Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid bio-surfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism // Langmuir. 2010. V. 26, № 11. P. 8567–8572.



Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

**Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ**

| | |
|-------------------------|---|
| Автор работы | Мирзаянова Миляуша Каримовна |
| Подразделение | Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ |
| Тип работы | Выпускная квалификационная работа |
| Название работы | МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА BACILLUS ALTITUDINIS API – 2019 |
| Название файла | Мирзаянова М.К..docx |
| Процент заимствования | 25.80 % |
| Процент самоцитирования | 0.00 % |
| Процент цитирования | 1.36 % |
| Процент оригинальности | 72.84 % |
| Дата проверки | 07:49:10 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 ФИО проверяющего |
| Дата подписи | 9.06.20 ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА Подпись проверяющего |

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



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

ОТЗЫВ

на дипломная работа студента группы Б-401
 (Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Мирзаянова Миляуша Каримовна
 (Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Микробиологическая характеристика штамма *Bacillus altitudinis* api – 2019.

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию
 Объем текстовой части 45 листа А4, 5 рисунка. 1) Литературный обзор: Анализ характеристики биосурфактантов (13 с.). 2) Материалы и методы исследования: Объекты исследования методика проведения исследования (8 с.). 3). Результаты исследования и их обсуждение. Исследование методов микробиологических характеристик штамма *B. altitudinis* (6 с.). 4). Заключение (1 с.). 5). Список использованных источников (84 наименов.). 6). Приложения: Приложение А.Б.В.Г. Д.

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР). Методы и способы решения конкретных проблем, представленных в ВКР, основные достоинства и недостатки ВКР.
 В данной работе указаны методы, позволяющие определить биосурфактанты, синтезирующиеся *B. altitudinis*.

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.
 при написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР При выполнении квалификационной работы выпускником был соблюден график подготовки

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 оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР)

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

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

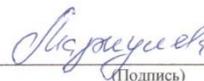
10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое результаты полученные в процессе исследования, могут быть использованы в дальнейшей реализации в учебном процессе

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

Руководитель выпускной квалификационной работы

Маркушева Татьяна Вячеславовна, профессор

(Фамилия, имя, отчество, должность)


 (Подпись)

« » 20 года

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломная работа студента группы Б-401
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Мирзаянова Миляуша Каримовна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Микробиологическая характеристика штамма Bacillus altitudinis api - 2019

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

Объем текстовой части 45 листа А4, 5 рисунков. 1) Литературный обзор: Анализ характеристики биосурфактантов (13 с.). 2) Материалы и методы исследования: Объекты исследования, методика проведения исследования (8 с.). 3) Результаты исследования и их обсуждение. Исследование методов исследования микробиологических характеристик штамма *B. altitudinis* (6 с.). 4) Заключение (1 с.). 5) Список использованных источников (84 наименов.).

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

В данной работе указаны методы, позволяющие определить биосурфактанты, синтезирующиеся *B. altitudinis*.

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.
квалификационной работы выполнена полностью

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

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств при написании работы
использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

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.
выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную и патентную литературу

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

Работа оформлена в соответствии с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР)

9 Обоснованность выводов и предложений

В работе выводы были сделаны на основании литературных данных

10 Замечания по усмотрению рецензента

Отсутствие экспериментальных действий

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. результаты полученные в процессе исследования, могут быть использованы в дальнейшей реализации в учебном процессе

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

Рецензент
доцент кафедры ФПМ
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

(Место работы, занимаемая должность)

М.П.*

Титова Т.Н.

(Инициалы и фамилия)

« ____ » _____ 20 ____ года

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением биологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Мирзаяновой Миляуши Каримовны

Тема: «**Микробиологическая характеристика штамма *Bacillus altitudinis* api – 2019**»

Выпускная квалификационная работа соответствует предъявляемым требованиям и выданному заданию. Работа содержит 3 основные части (литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение), а также введение, заключение, вывод и литературный список. Все части логически связаны между собой и с темой ВКР.

Мирзаянова М.К. показала хорошие аналитические способности, умение анализировать и систематизировать собранную информацию, а также делать самостоятельные выводы, предложения и обобщения.

Графическая и текстовая часть были выполнены с использованием персонального компьютера и редакторов Word, Power Point, Excel.

Выпускная квалификационная работа считается завершенной, и может быть рекомендована к защите с оценкой «отлично».

канд.биол.наук, доцент
кафедры специальной химической технологии
ФГБОУ ВО «УГНТУ»



З.Р. Бикмурзина

Сертификат

Мирзаянова Милауша Каримовна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2019
High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 25 октября 2019 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич

Сертификат

Мирзаянова Миләүшә Каримовна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018
High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич



Международная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)
Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням (ESCMID)

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Министерство здравоохранения Республики Башкортостан

Центинский университет
Бугарский государственный медицинский институт имени Абу Али Ибн Сино
Ассоциация ВУЗов «Болга-Яцыз»
Российско-китайская ассоциация медицинских университетов (РКАМУ)

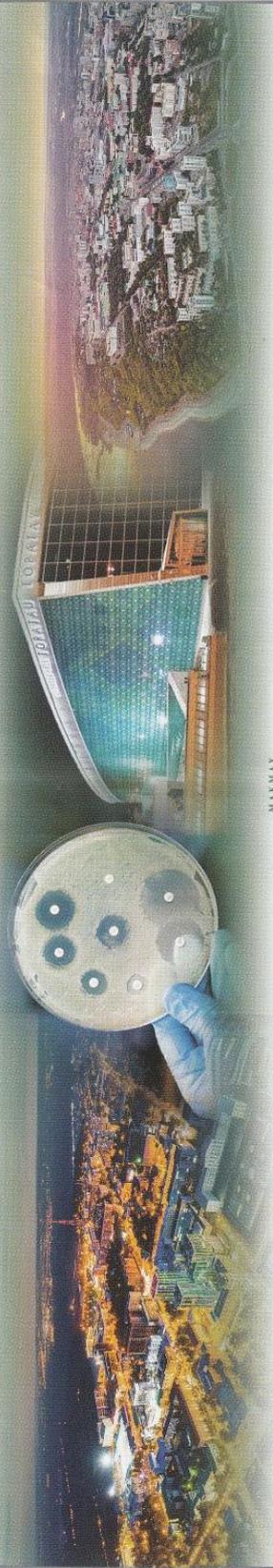
ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
НИИ антимикробной химиотерапии (НИИМАХ)

СЕРТИФИКАТ УЧАСТИЯ

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

Евразийский конгресс
по антимикробной терапии и клинической микробиологии

17 | 18 | октябрь | 2019



МАКМАХ
IAS MAC

Р. С. Козлов
Президент Межрегиональной ассоциации
по клинической микробиологии
и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Р. С. Козлов