

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*

**Шаяхметова Анжелика Ильшатовна**

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВОЛОС,  
ПОРАЖЕННЫХ *MICROSPORUM SPP.*, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ  
ФИЛЬТРАТОВ ШТАММОВ-КАНДИДАТОВ В ПРОБИОТИКИ.**

Научный руководитель:  
доцент, к.б.н.



Р.А.Фатхутдинова

Уфа – 2021

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Использование культур микроорганизмов и их продуктов метаболизма для лечения микробных инфекций.....	7
1.2. Характеристика пробиотиков, обладающих антифунгальными свойствами.....	17
1.3. Виды <i>Bacillus</i> в качестве потенциальных кандидатов пробиотиков для лечения грибковых инфекций.....	27
1.4. Антимикотики природного происхождения .....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	31
2.1. Объекты исследования .....	31
2.2. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий.....	31
2.3. Методы исследования.....	33
2.3.1. Метод последовательных разведений суспензии бактерий.....	33
2.3.2. Посев суспензий на агаризованную питательную среду Сабуро.....	34
2.3.3. Подсчет выросших колоний бактерий на чашках Петри.....	34
2.3.4. Приготовление сурфактанта.....	35
2.3.5. Обработка волос инфицированных микроспорией биосурфактантом (в разведении 1:10, 1:100, 1:1000).....	35
2.3.6. Оценка бактериальной активности биосурфактанта, полученного из <i>Bacillus altitudinis</i> , на грибковую культуру <i>Microsporium spp.</i> .....	36
ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
3.1. Результат последовательных разведений суспензии бактерий.....	37
3.2. Результат посева суспензий бактерий на агаризованную питательную среду Сабуро.....	38
3.3. Результат определения количества колоний бактерий в исследуемых	

разведениях 1:10, 1:100, 1:1000 .....	39
3.4. Результаты приготовления биосурфактанта.....	41
3.5. Результаты обработки биосурфактантом (1:10, 1:100, 1:1000) волос, инфицированных микроспорией. ....	42
3.6. Результаты оценки бактериальной активности биосурфактанта, полученного из <i>Bacillus altitudinis</i> , на грибковую культуру <i>Microsporium spp.</i> .....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Микроспория — инфекционное заболевание, протекающее с поражением кожи и ее придатков, вызываемое патогенными грибами рода *Microsporum*. В настоящее время микроспория является самой распространенной инфекцией среди дерматофитий и занимает второе место после микозов стоп. Заболеваемость микроспорией остается на относительно высоком уровне, что составляет в среднем 40,5 случая на 100 тыс. населения. Этому способствует ухудшение социально-экономической ситуации, экологической обстановки, рост числа бродячих животных и недостаточная работа ветеринарной и коммунальных служб города по их санации. В последние годы стали регистрироваться больные с хроническим течением заболевания на фоне тяжелых системных поражений (красная волчанка, гломерулонефрит, хронического кожно-слизистый кандидоз), а также иммунодефицитов и интоксикаций. Проблема терапии микроспории вызвана высокой устойчивостью возбудителей к большинству существующих антимикотических препаратов. Организация борьбы с микроспорией не только задача врача дерматовенеролога, но и проблема социальной значимости.

*M. canis* вызывает микроспорию у 90–97 % больных на территории России. *M. canis*, являясь зоофильным грибом, вызывает дерматофитозы у кошек, собак, обезьян, реже — у других животных. Основным источником заболевания — кошки (обычно котята), реже собаки. Чаще страдают дети до 15 лет. Взрослые же болеют редко, в основном — молодые женщины. Редкость заболевания микроспорией взрослых объясняется наличием в волосах взрослых людей фунгистатических органических кислот (в частности, ундициленовой кислоты). Заражение происходит при

непосредственном контакте с больным животным или, предметами, инфицированными шерстью или чешуйками. Возникновение в ряде районов и городов очагов микроспории кошек и собак ведет к формированию эпидемических очагов среди детей. Возможна передача зоонозной микроспории и от заболевших членов семьи (5,5 %), что встречается достаточно редко. Следует подчеркнуть, что в подобных ситуациях наибольшей опасности заражения подвергаются женщины и дети младшего возраста, включая новорожденных. Помимо непосредственного переноса возбудителя от больного человека здоровому, возможно заражение микроспорией через различные предметы обихода. Заболеваемость зоонозной микроспорией не одинакова в течение года. Сезонные колебания связаны с приплодом у кошек, а также более частым контактом детей с животными в летний период. Подъем заболеваемости начинается в конце лета, когда в августе-сентябре дети возвращаются в город и осматриваются родителями и медработниками при поступлении их в школу и детские сады. Пик заболеваемости приходится на октябрь-ноябрь, а затем происходит ее снижение до минимума в марте-апреле.

**Цель исследования.** Выявить способность сурфактанта *Bacillus altitudinis* оказывать фунгистатический эффект на развитие грибковой инфекции *Microsporum spp.*

**Задачи исследования:**

1. Получить методом разведения градиент концентрации бактерий *Bacillus altitudinis* для исследования оптимальной концентрации, пригодной для эффективного лечения (1:10, 1:100, 1:1000).

2. Приготовить биосурфактанты из культуры бактерий в разведении 1:10, 1:100, 1:1000.

3. Провести инкубацию пораженных микроспорией волос в исследуемых концентрациях сурфактанта *Bacillus altitudinis* в течение 3-х суток воздействия.

4. Проанализировать результаты структурных изменений инфицированных волос после воздействия препаратом сурфактантом – *Bacillus altitudinis*.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Использование культур микроорганизмов и их продуктов метаболизма для лечения бактериальных и грибковых инфекций

Точечное применение супернатанта культуры *Lactobacillus* увеличивает восстановление и заживление ран при травматических инфекциях.

Виды *Lactobacillus* были предложены в качестве потенциальных кандидатов для лечения инфекций ран из-за их способности понижать рН, уменьшать воспаление и выделять антимикробные соединения. Исследование влияния секретлируемых продуктов лактобацилл (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*) на патогенные микроорганизмы в ране в пробирке и в модели инфекции мышинной раны при оценке 1-5 дневной лактобациллы в кондиционированных средах (КС) выявила максимальное ингибирование возбудителей с использованием пятидневного КС в отношении раны. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для пятидневных *Lactobacillus* КС тестировали путем разведения КС в бульоне Мюллера-Хинтона (МХ) от 0-25% и было обнаружено, что оно составляет 12,5% для *A. baumannii*. Концентрирование КС до 10X центрифугой с фильтром 3kDA снизило показатель КС МИК до 6,25-12,5% для *A. baumannii* планктонных клеток. Минимальное влияние пятидневных КС наблюдалось по отношению к бактериальным биопленкам. Никакой токсичности не наблюдалось при введении этих КС *Lactobacillus* в червей *Galleria melonella*. Для исследования мышинной раны с *A. baumannii*, улучшенная выживаемость наблюдалась после местного лечения *L. acidophilus* или *L. reuteri*, в то время как лечение *L. reuteri* само по себе улучшало заживаемость раны. В целом, это исследование

предполагает, что местное применение некоторых видов побочных продуктов *Lactobacillus* может быть эффективным против грамотрицательных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), таких как как *A. baumannii*.

Раны, полученные на поле битвы, часто травматичны и сильно загрязнены чужеродными бактериями почвы и, таким образом, склонны к развитию изнурительных бактериальных инфекций. Патогены с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) являются одной из основных причин инфекций среди военнослужащих в США [1]. Годовая стоимость инфекций МЛУ в США оказывается результатом трат миллиардов долларов и оценивается в 15-36 миллионов долларов только для армии США.

Статистические данные показывают, что отдельными причинами раневых инфекций у 46-51% пациентов были *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium* и *Klebsiella spp.* В дополнение к переносу генов, которые придают устойчивость к антибиотикам, патогены МЛУ обычно проявляют повышенную толерантность к антибиотикам из-за образования защитных биопленок. Перед наступлением медицинского кризиса необходимо разработать новые терапевтические стратегии, которые могут побороть микроорганизмы МЛУ. В 2014 году были использованы микрочипы и секвенирование для определения микробиома из 61 боевого ранения полностью заживляемого (38) и незаживающего (23) [7].

Как и ожидалось, *A. baumannii* фигурировал в случаях с не заживающим вариантом ранения, *S. aureus* был обнаружен только в нескольких ранах, но неожиданно популяции кишечных бактерий были связаны с успешным заживлением раны. Это интересное наблюдение несет в себе множество возможностей, таких как: повышенный



кислотный pH раны позволяет непатогенным кишечным бактериям захватывать микробиом раны, и / или что применение рационально выбранных кишечных бактерий может улучшить заживление ран. Таким образом, логичным следующим шагом будет использование бактерий, продуцирующих молочную кислоту, таких как лактобациллы, для улучшения заживления ран.

Было высказано предположение, что бактерии, продуцирующие молочную кислоту, являются отличными кандидатами для содействия заживлению раневой инфекции, конкурируя с патогенами за связывание с тканью носителя [8], стимулируя выработку противовоспалительных цитокинов, модулирующих иммунные клетки носителя, такие как уменьшение нейтрофильного NETosis [9], снижение pH, высвобождение антимикробных соединений, таких как бактериоцины или молочная кислота, и дезактивация патогенных факторов вирулентности [10]. Растет число исследований проведенных в условиях лаборатории, документирующих антибактериальный потенциал пробиотиков *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* против патогенов раны МЛУ [11-14].

В добавление к этому, сообщалось, что лизаты из *Lactobacillus rhamnosus* и *reuteri* стимулируют реэпителизацию кератиноцитов, а в другом исследовании живые клетки, лизат и кондиционированные среды *L. rhamnosus* были способны защитить эпидермальные кератиноциты от токсичности *S. aureus* [8,15]. Многие исследования, проведенные в условиях лаборатории, показали, что живые культуры *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* и *L. reuteri*), вводимые местно [16-21] или перорально [22-24], могут способствовать закрытию неинфицированных ран грызунов.

Исследования с использованием культур и побочных продуктов

лактобацилл для местного лечения инфицированных ран были сосредоточены на патогенах *S. aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*; выявляли успех во многих различных моделях инфекции, включая абсцесс, травму нижней челюсти, рану и ожог/сепсис [25-30]. Клинически, культуры из 10 возведенных в 5 степень *L. plantarum* безопасно и эффективно применялись местно для пациентов с диабетической хронической раной и ожоговой раной в южноамериканских клинических исследованиях [31,32].

При применении живых бактерий или их побочных продуктов всегда существует проблема безопасности, и даже лактобациллы могут вызвать сепсис у людей с серьезным ослабленным иммунитетом. Два ретроспективных исследования показали в общей сложности 81 случай сепсиса *Lactobacillus*, двумя главными причинными штаммами сепсиса были *L. rhamnosus* и *Lactobacillus casei* [33,34]. Это, по-видимому, специфично для штамма и подчеркивает тщательный отбор штаммов лактобацилл для использования на критически больных пациентах в соответствующих доклинических исследованиях. В этом исследовании были выделены кондиционированные среды из различных видов *Lactobacillus*. Их культивировали 1-5 дней по длительности и оценивали антимикробную активность против планктонных и биопленочных клеток *A. baumannii*.

Более старые кондиционированные среды концентрировали, а антимикробную активность и стабильность количественно определяли при различных концентрациях. Кроме того, было показано, что КС защищает мышей с ослабленным иммунитетом на модели травматической раневой инфекции и улучшает закрытие раны. В целом это исследование показывает, что местное применение некоторых побочных продуктов видов *Lactobacillus* может быть эффективным

против раневых патогенов, таких как *A. baumannii*.

Бактериальные штаммы. Обоснование состоит в том, что при изучении кондиционированных сред *Lactobacillus* из разных классов можно выделить различные продуцированные метаболиты (лактат, D по сравнению с L, ацетат, диоксид углерода) по воздействию на патоген МЛУ, такой как *A. baumannii*, и на среду раны. Клинически значимый класс метаболизма связан с инфекцией человека и здоровыми состояниями. Например, гетероферментативные лактобациллы были в основном выделены у пациентов с пародонтитом, но в обязательном порядке гомоферментаторы обнаруживаются преимущественно в пероральном микробиоме здоровых пациентов [36]. Кроме того, гетероферментаторы были обнаружены в микробиоме пожилых популяций по сравнению с гомоферментаторами, которые, как было показано, колонизируют кишечник взрослых популяций [37]. Используемые виды имеют следующие метаболические обозначения: *L. acidophilus* (обязательно гомоферментативный), *L. casei* (факультативно гетероферментативный), *L. reuteri* (обязательно гетероферментативный) [38].

Представляет также интерес склонность видов *Lactobacillus* вызывать сепсис у пациентов с ослабленным иммунитетом у людей. Гипотеза гласит о том, что более «патогенный» *Lactobacillus* будет менее подходящим в качестве лечения на моделях инфекции у животных. Хотя сепсис *Lactobacillus* очень редко встречается, были отмечены следующие относительные показатели в общей сложности из 81 (53 и 28 случаев) сепсиса *Lactobacillus*: *L. acidophilus* (5 случаев- средняя частота), *L. casei* (19 случаев – высокая частота), *L. reuteri* (1 случай – низкая частота) [33,34].

Беспокойство о живых культурах, которые вероятно вызывают

сепсис или способствуют инфекциям, стало причиной исследования супернатантов культуры *Lactobacillus*. Выделение *Lactobacillus* для роста и кондиционированной среды (КС): Лактобациллы культивировали статически при 37°C в течение 1-5 дней в среде медицинской приемной станции (МПС) с 5% CO<sub>2</sub> в отдельных пробирках в день исследования, и pH измеряли ежедневно с помощью настольного pH-метра FE150 и зонда (Фишер Сайентифик Питтсбург, США). Ежедневно соответствующие культуры серийно разводили в сополимере стирола и бутадиена и наносили пятно на чашки с агаром МПС, а оставшиеся культуры центрифугировали при 1200 × g в течение 10 минут.

Надосадочную жидкость выливали, стерильно фильтровали через шприц-фильтр 0,2 мкм и хранили при 4°C. Пятидневные супернатанты концентрировали с добавлением к центробежным фильтрующим элементам Amicon (МилипурСигма, Берлингтон, Массачусетс, США) с отсечкой 3 кДа и вращали при 4000 xg в течение 1 часа с получением 10X кондиционированной среды. Ингибирование планктонных клеток с помощью КС: *Planktonic A. baumannii* клетки выращивали до логарифмической фазы в LB и разбавляли до  $2 \times 10^6$  колониеобразующих единиц (КОЕ) / мл в бульоне Мюллера-Хинтона (МХ). Сто микролитров инокулята бактерий отбирали в аликвотах в отдельные лунки 96, а также 100 мкл разведенного *Lactobacillus* SM в различных концентрациях в МХ отбирали в соответствующие лунки в формате минимальной ингибирующей концентрации (МИК). МПС использовали в качестве контроля.

Инокулированные 96-луночные экземпляры инкубировали при 37°C в течение 12 ч. OD<sub>600</sub> экземпляров был измерен для расчета плотности бактерий для точного приготовления разведений инокулята. Дисперсия биопленки. После удаления планктонных клеток из каждой

лунки 96-луночных экземпляров (образование статической биопленки) лунки осторожно промывали сополимером стирола и бутадиена и добавляли 0,1 мл 0,01% раствора кристаллического фиолетового (мас. / об.). После 30 мин инкубации при комнатной температуре раствор кристаллического фиолетового отбрасывали, лунку промывали сополимером и добавляли 0,1 мл изопропанола. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, и плотность биопленки измеряли с помощью ОД595.

Снижение показаний ОД595 свидетельствует о снижении биопленки. Безопасность концентрированного супернатанта *Lactobacillus* в модели воскового червя *Galleria melonella*: глистам *Galleria melonella* инъецировали в последний левый проток 5 мкл концентрированной КС *Lactobacillus* с использованием 10 мкл шприца Гамильтона (Фишер Сайентифик Питтсбург, США). После инъекции червей инкубировали при 37 ° С в течение пяти дней и отслеживали на предмет смерти. Смерть определялась изменением цвета на черный и отсутствием движения при раздражении.

Самок мышей BALB/c в возрасте от шести до восьми недель предварительно обрабатывали циклофосфамидом для блокирования иммунного ответа в день минус 4 (150 мг / кг) и день минус 1 (100 мг / кг). В день заражения (день 0) мышей полностью анестезировали, спину сбрасывали электрической бритвой, а область операции стерилизовали йодом и 70% спиртом. Затем с помощью 6-миллиметрового стерильного пуансона для биопсии была сделана эксцизионная кожная рана полной толщины и инокулирована 106 КОЕ *A. baumannii*, AB5075-lux.

Затем рану покрывали повязкой Тегадерм (3М, Мэйплвуд, Миннесота, США) и герметизировали с помощью Ветбонд (3М, Мэйплвуд, Миннесота, США). Начиная с четырех часов после

инокуляции и до 5-го дня мышам местно вводили 50 мкл обработки (под повязкой и поверх раны): сополимера или пятидневного 10-кратного КС из: *L. acidophilus*, *L. reuteri* или *L. Casei*. На 6-й день повязка Тегадерм была удалена, и рана контролировалась до 20-го дня. Площадь раны измерялась с помощью прибора для измерения силуэта *Aranz* (*Aranz Medical*, Крайстчёрч, Новая Зеландия), и вариант выражающий *A. baumannii*, был пересчитан с помощью системы *Ivis* в условиях пробирки, системы *Lumina XR* (*Ivis Technologies*, Феникс, США) для количественной оценки. Все процедуры выполнялись в соответствии с протоколами, утвержденными Научно-исследовательским институтом армии Уолтера Рида (WRAIR) / Научно-исследовательским центром по военно-морским медицинским исследованиям (NMRC) в соответствии со всеми применимыми федеральными правилами, регулирующими защиту животных в исследованиях.

Пяти процентное среднее было подсчитано, исключая 2 мыши на группу (1 мышь с наименьшим и 1 мышь с наибольшим общим размером раны, суммированным по каждой временной точке), затем выполняя двухсторонний ANOVA и тест Тьюки проведенный постфактум. Результаты приведены по схеме «возраст против ингибирующей активности супернатантов *Lactobacillus*». Одним из первоначальных вопросов было то, как возраст культуры *Lactobacillus* влияет на антимикробную активность супернатантов против обычно изолированных возбудителей боевых ран, таких как *A. baumannii*.

Используемый штамм *A. baumannii* представляет собой клинический изолят с множественной лекарственной устойчивостью, AB5075, высоко охарактеризованный исследователями в военной сфере[35] и модифицированный, чтобы быть биолюминесцентным и, как сообщается, чувствительным к терапии бактериофагом [41,42]. Для

определения антимикробной активности статические культуры *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* инкубировали в течение 1-5 дней, КС экстрагировали и разводили на 0-25% в инокулированный раствор МХ (рис. 1). ОД 600 измеряли через 24 часа, и получали заготовки с различными концентрациями МХ и МПС и вычитали из соответствующих значений.

Для *L. acidophilus* КС значительная антимикробная активность в отношении *A. baumannii* не наблюдалась по сравнению с контролем МПС (рис. 1А). КС *L. casei* продемонстрировал значительную антимикробную активность 6,25% КС в возрасте 4-5 дней в сравнении с *A. baumannii* (рис. 1В). Что касается КС *L. reuteri*, все возрасты КС проявляли значительную ингибирующую активность, особенно в концентрации 25%, в сравнении с *A. baumannii*. Однако не было сопоставимых различий между возрастными культурами по активности антимикробной активности. За исключением КС *L. reuteri*, минимальное ингибирование наблюдалось при культивировании однодневных КС, и часто более старые культуры были значительно более ингибирующими по сравнению с ранним временем культивирования.

Чтобы определить, коррелирует ли стадия роста бактерий с патогенной ингибирующей активностью КС, колониеобразующие единицы *Lactobacillus* подсчитывают ежедневно через серийное разведение и высевают на чашки МПС. Популяция *L. reuteri* показала экспоненциальный рост до 10<sup>10</sup> КОЕ / мл к 1 дню, а затем быстро перешла к фазе смерти. Другие лактобациллы достигли стационарной фазы ко 2-му дню, а затем после 4-го дня началась фаза смерти. В целом, эти данные свидетельствуют о том, что культуры *Lactobacillus* в стационарной / смертельной фазе увеличивают антимикробную активность против грамотрицательных патогенов.

Что касается pH культур *L. acidophilus*, pH стал более кислым с увеличением возраста культуры до максимального значения при среднем pH 4,1 на пятый день (рис. 2B). Среднее значение pH культуры *L. casei* достигло 3,9 на второй день и оставалось на уровне среднего значения 3,6-3,7 на 3-5 день. Культуры из *L. reuteri* оставались неизменными с 1-5 дня при значении - 4,2. Эти данные также свидетельствуют о том, что повышенная кислотность КС приводит к большей антибактериальной эффективности против *A. baumannii*. Влияние концентрации на ингибирующую активность пятидневных супернатантов *Lactobacillus*. МПС пятидневных *Lactobacillus* КС тестировался с помощью показаний ОД600 и точечной подсадки против планктонных патогенов. МПС пятидневного КС для *A. baumannii* составила 12,5% (таблица 1).

Оценка (проведенная в лабораторных условиях) концентрированных супернатантов *Lactobacillus*. Безопасность пятидневной 10-кратной КС была оценена на модели инфекции червя *Galleria melonella*, где неинфицированным червям вводили 10-кратную КС. В целом, в обработанных популяциях червей системной токсичности или смерти не наблюдалось. Так как только 10X КС был безопасен для этого вида червей, следующий вопрос состоял в том, насколько эффективна пятидневная *Lactobacillus* 10X КС при местном применении? Чтобы ответить на этот вопрос, была использована модель травматической мышинной раны *A. baumannii*, в которой мышей BALB/c лечили циклофосфамидом, анестезировали и делали рану полной толщины, которая была немедленно инокулирована штаммом *A. baumannii-lux*.



## **1.2. Характеристика пробиотиков, обладающих антифунгальными свойствами**

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) представляет собой серьезную угрозу для здоровья во всем мире, что приводит к снижению эффективности антибактериальных, противопаразитарных, противовирусных и противогрибковых препаратов. Одним из наиболее перспективных направлений может считаться использование бактериоцинов, полученных из молочнокислых бактерий.

Штамм *L.rhamnosus* ВТК 20-12 был выделен из традиционного армянского натурально сброженного соленого сыра. Пробиотический потенциал штамма был проверен. Было доказано, что штамм продуцируется менее чем с двумя бактериоцинами (BCN1 и BCN 2) с разной молекулярной массой (1427 Да и 602,6 Да соответственно). Бактериоцины ингибируют рост бактерий с множественной лекарственной устойчивостью различной этиологии. Они относятся к разным таксономическим группам с разнообразной производительностью в зависимости от свойств бактериоцинов, а также от источников выделения патогенных микроорганизмов. Таким образом, бактериоцины *L.rhamnosus* ВТК 20-12 имеют белкоподобную природу, широкий спектр действия и являются отличными кандидатами для разработки новых профилактических и терапевтических веществ для дополнения или замены обычных антибиотиков.

За последние несколько лет интерес к функциональным продуктам питания вырос, на этом рынке лидируют по продажам пробиотические молочные продукты.

Термин биофункциональной пищи обычно используется, когда желаемый биологический, медицинский или физиологический эффект

оказывают микроорганизмы [11]. Пробиотики могут сбалансировать кишечную микробиоту, и, следовательно, отрегулировать правильную функцию кишечника и быть эффективными в профилактике/лечении ряда желудочно-кишечных расстройств, таких как инфекционная диарея, диарея, связанная с применением антибиотиков, детская инфекционная диарея, диарея при путешествиях, синдром раздраженного кишечника или болезнь Крона [6].

Многие виды бактерий обладают пробиотическими свойствами; тем не менее, наиболее изученные группы включают молочнокислые бактерии (ЛАБ) и бифидобактерии. ЛАБ проявляет сильную антагонистическую активность против многих микроорганизмов в результате производства органических кислот, перекиси водорода, диацетила, ингибирующих ферментов и бактериоцинов. Некоторые *Lactobacilli* синтезируют антимикробные соединения, которые связаны с бактериоцином группы. Например, *L.casei*, *L.acidophilus* и *L.bulgaricus* могут продуцировать антимикробные агенты, такие как ацидофилин и болгарин, которые могут подавлять рост патогенных микроорганизмов. Различные пробиотические штаммы могут стать источником сотен (тысяч) низкомолекулярных (LMW) биологически активных веществ (бактериоцинов и других противомикробных молекул, короткоцепочечных жирных кислот, различных других жирных и органических кислот, биосурфактантов, полисахаридов, пептидогликанов, антиоксидантов, различных процессов, аминокислот, факторов роста и свертывания, дефензиноподобных молекул и др.) Конкретные представители этих соединений LMW могут быть использованы для изготовления пищевых добавок, функциональных продуктов питания и лекарственных средств (для профилактики и лечения хронических заболеваний человека), а также спортивных и

омолаживающих продуктов и т. д. Бактериоцины из грамположительных бактерий: рибосомально синтезированные, обычно катионные, амфифильные, проницаемые для мембран пептиды, размером приблизительно 2–6 кДа [14]. Бактериоцины отличаются от большинства терапевтических антибиотиков тем, что они являются белковыми агентами, которые быстро перевариваются протеазами в пищеварительном тракте человека. Таким образом, штаммы, продуцирующие бактериоцин, могут быть альтернативой антибиотикам и имеют к тому потенциал, могут быть полезными в качестве средства борьбы с переносом патогенных микроорганизмов, таким образом, являясь микробной пищевой добавкой.

*Lactobacillus rhamnosus* встречается в различных местах обитания. Тем не менее, только несколько работ были опубликованы по бактериоцинам, которые продуцируются штаммами *L.rhamnosus*, например штамм GG, штамм LC-705 [8]. В настоящее время клинически доказано только то, что штаммы *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus reuteri* эффективны при введении вагинально один раз в неделю или два раза в день перорально, уменьшают рецидивы ИМП и восстанавливают лактобациллы до нормы во влагалищной флоре у пациентов. Доказано, что ежедневное пероральное употребление *L.rhamnosus* и *L.fermentum* тоже способно изменить вагинальную флору [12]. Антимикробные белки, продуцируемые *L.rhamnosus*, отличаются от бактериоцинов, продуцируемых другими видами *Lactobacillus*, поскольку они проявляют широкий спектр активности против грамположительных и грамотрицательных организмов и могут принадлежать к наименее охарактеризованному четвертому классу комплекса бактериоцинов. *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) представляет собой штамм *L.rhamnosus*, выделенный в 1983 году из

кишечного тракта здорового человека. Доказал свою полезность в профилактике ротавирусной диареи у детей. Из *Lactobacillus rhamnosus* GG было охарактеризовано семь небольших пептидов, два из которых были NPSRQERR и PDENK, которые сохранили антимикробную активность, обнаруженную в условных средах LGG [27].

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) может оказывать противовоспалительное действие на кишечник. Недавние исследования показывают, что пробиотические факторы, высвобождаемые из живых пробиотиков, могут демонстрировать полезные свойства против патоген-индуцированного воспаления. Таким образом, было высказано предположение, что пробиотические супернатанты могут представлять собой ценный источник новых антипатогенных соединений [3]. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 - это пробиотики, которые были выделены из желудочно-кишечного тракта человека. Молекулярный вес бактериоцина, продуцируемого *Lactobacillus rhamnosus* HN001 составляет менее 3,5 кДа [2]. Штаммы *Lactobacillus rhamnosus* ST 461BZ и ST462BZ были выделены из Боза. Частично очищенные бактериоцины ST 461BZ и ST462BZ ингибировали рост *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Бактериоцины ST 461BZ и ST462BZ имеют размер приблизительно 2,8 кДа и 8,0 кДа соответственно [25]. *Lactobacillus rhamnosus* 68 происходит из желудочно-кишечной флоры человека. Молекулярная масса пептида, оцененная по масс-спектрометрии составила 6433•8Да.

В последние десятилетия устойчивость к антибиотикам становится все более и более глобальной проблемой общественного здравоохранения. В Европейском регионе ВОЗ резистентность некоторых патогенов в настоящее время достигает более 50% в некоторых странах, новые устойчивые организмы появляются и быстро

распространяются. Возрастающая проблема распространенности патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам, мотивируют на поиск альтернативных природных микробных препаратов, в том числе на изучение пробиотических молочнокислых бактерий и их бактериоцинов. Некоторые из наиболее проблемных лекарственно-устойчивых патогенов на сегодняшний день: устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, устойчивый к множественным лекарственным средствам *Streptococcus pneumoniae* и устойчивые к ванкомицину *Enterococcus spp.* среди грамположительных бактерий и лекарственно-устойчивых бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* среди грамотрицательных бактерий [28]. *Proteus mirabilis* вызывает 90% инфекций *Proteus* и может считаться инфекцией приобретаемой в обществе. *Proteus vulgaris* и *Proteus penneri* легко изолируются в учреждениях долгосрочного ухода и больницах от пациентов с сопутствующими заболеваниями или скопрометированной иммунной системой [7].

Приготовление инокулята и получение бесклеточного культурального вещества. *L.rhamnosus* БТК 20-12 выращивали в MRS веществе (рН 6,4), в термостате при 37°C и в течение 24 часов. По окончании роста культуральную жидкость центрифугировали при 6000 xg (скорость центрифуги) в течение 20 мин и полученную бесклеточную культуральную жидкость (жидкость ХФУ) использовали для дальнейшей очистки.

Очистка жидкости ХФУ. Для очистки антимикробных веществ, очистки ХФУ жидкостью от иона использовали обменную хроматографию [1], а затем методы гель-фильтрации. После ионного обмена хроматографией, получая частично очищенные элюенты, фракционировали методом гель-фильтрации на базе сверхтонкой смолы

Sephadex G-25 (1,5 x 50 см, объем 100 мл). Каждая фракция (n = 45), элюированная из колонки, была протестирована на антибактериальную активность в отношении теста *Salmonella typhimurium* G38 и *Bacillus subtilis* 17-89 культур. Фракции, проявляющие бактерицидные свойства, объединяли и выпаривали в вакууме при температуре 50-55°C, остаточное давление было 0,01 МПа.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Фракции, полученные методом гель-фильтрации, очищали ВЭЖХ методом с применением различных систем (полупрепаративная колонка "Avex ODS" C18 (8 на 250 мм, Waters and Shimadzu, Япония); Аналитическая колонка Shimadzu LC-20 C18 (4,6 на 250 мм, Symmetry, США, с детектор диодной матрицей СПД-20а, автосамплер). Элюент состоял из бидистиллированной воды, трифторуксусной кислоты (TFA) и ацетонитрила (ВЭЖХ «SIGMA», США) [4]. Объем впрыска образца 100 мкл. Элюция контролировалась на различных диапазонах длин волн 190-400 нм. Детектирование проводилось при длинах волн 210, 254, 280 нм. Фракции элюированные из колонки лиофилизировали, растворяли в 150 мкл бидистиллированной воды и тестировали на антибактериальные свойства. Фракции, проявляющие максимальную антимикробную активность, были отобраны.

Масс-спектрометрия. Массовый анализ BSN зарегистрированных с использованием API 4000 («AB Sciex Instruments», США) проводился в режиме ионизации электронов. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации распылением положительных электронов (ESI) с массой / зарядом ( $m/z$ ) в диапазоне 100–2000  $m/z$ .

Определение антимикробной активности. Антимикробную активность образцов (аликвоты по 100 мкл) оценивали с помощью метода точечного отделения, измерения размера зоны ингибирования

(диаметра) роста тестируемой культуры ( $\emptyset$ , мм) через 24 ч инкубации в термостате при 30°C. Антимикробная активность рассчитана по [19] и выражена в произвольных единицах (AU / мл).

Определение пробиотических свойств. Чувствительность ЛАБ к желчи и рН, ферментам. Штамм *L.rhamnosus* ВТК-20-12 инкубировали в веществе MRS с содержанием определенного количества желчи в течение 24 часов при 37°C в термостате.

Выживание *L.rhamnosus* ВТК 20-12 в условиях, близких к таковым в кишечнике (влияние пищеварительных ферментов, рН в диапазоне 3,0-8,0 проверяли по общепринятой методике [26; 22; 17].

Определение способности к адгезии проводилось по [9]. Антиоксидантная активность ЛАБ была определена согласно [21].

Влияние ферментов на бактерицидную активность бактериоцинов. Чтобы исследовать чувствительность бактериоцинов, различные ферменты, нейтрализованные образцы АМФ, обрабатывали протеиназой-К (36 ед. / мг, сигма), трипсином (чистым из бычьей поджелудочной железы 3х, активность 2500 NFU / мг, HIMEDIA), пепсином (особо чистым 1: 3000, HIMEDIA).

Ферменты добавляли в образцы в конечной концентрации 0,5 мг / мл. Через 2 часа инкубации с протеиназой К и трипсином при 37°C, а также пепсином при 25°C образцы нагревали при 100°C в течение 5 мин для инактивации ферментов, потом были определены остаточные активности [13].

Молочнокислые бактерии *Lactobacillus rhamnosus* ВТК 20-12, выделенные из традиционных натурально сброженных соленых сыров в Армении штамм *L.rhamnosus* ВТК 20-12 синтезирует антимикробные вещества в поздней логарифмической фазе роста (24 часа) в жидкой среде MRS при 37°C. Общая антимикробная активность жидкости ХФУ

составила 600 а.е./мл при конечном рН 3,8-4,2.

Секвенирование переменных областей генов, кодирующих 16S рРНК, подтвердило, что штамм *L.rhamnosus* ВТК 20-12 принадлежит к роду *Lactobacillus rhamnosus*. Анализ результатов секвенирования и построения дерева отношений скрининга базы данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемый штамм относится к следующим таксономическим группам: бактерии; *Firmicutes*; *Lactobacillales*; *Lactobacillaceae*; лактобактерии и гомология у некоторых видов рода *Lactobacillus* достигает 97,8%. Результаты представлены в графической форме.

Чтобы считать бактерии потенциальным пробиотиком, они должны обладать несколькими желательными свойствами, такими как преодоление низкой рН среды в желудочно-кишечном тракте и они должны прибыть на место действия в жизнеспособном физиологическом состоянии. Были исследованы основные пробиотические свойства штамма [26]. Результаты исследования показали, что *L.rhamnosus* ВТК 20-12 проявляют высокую жизнеспособность и выживают после воздействия протеолитических ферментов и солей желчи (0,2-0,8%). При рН 6,0 и 9,0 наблюдался максимальный рост штаммов. Наблюдалось снижение роста при рН от 2,0 до 4,0. Наблюдалась способность к адгезии к эпителиальным клеткам, антиоксидантная активность и устойчивость к антибиотикам.

Для очистки культуральной жидкости использовались разные методы. Очистка ионообменной хроматографией с последующей гель-фильтрацией (сефадекс G 25), проведенной согласно [1]. В таблице 1 представлены характеристики ХФУ очистки жидкости. В процессе очистки было выделено 2 фракции с бактерицидной активностью. Очистка жидкости ХФУ показала, что существуют различия между



антимикробной активностью и результатами полученных фракций. Изучение влияния различных ферментов на бактерицидную активность фракций показало, что бактерицидная активность фракций 1 и 2 была полностью устранена после обработки протеиназой К.

Для выявления природы полученных бактериоцинов было определено влияние различных ферментов на бактерицидную активность BCNs. Тест чувствительности к протеазе показал, что бактерицидная активность BCN 1 и BCN 2 была полностью исключена после обработки протеиназой К, что свидетельствует о том, что эти вещества являются белковыми по своей природе. Активность не была полностью инактивирована другими протеазами, такими как пепсин и трипсин. Активность BCN 1 снизилась только после лечения пепсином. Активность BCN 2 была частично инактивирована (около 50%) трипсином и пепсином. Результаты показаны в таблице 2. Однако тот факт, что BCN показали различную чувствительность по отношению некоторым протеазам предполагает, что они могут иметь различную химическую структуру.

Были изучены некоторые биохимические характеристики бактериоцинов. Для определения термостабильности BCN, их аликвоты нагревали при 40, 60, 80, 121°C в течение 15 и 30 минут и сразу же охлаждали в ледяной воде. Результат показал, что ингибирующая активность BCN 1 и BCN 2 была снижена на 50% и 75% соответственно в процессе обработки при 121°C в течение 15, 30 мин. Различные органические растворители были испытаны для экстракции BCNs, продуцируемые *L.rhamnosus* БТК 20-12. Бактерицидная активность обоих BCNs была признана стабильной при присутствии этанола и метанола в конечной концентрации 4%, мочевины в конечной концентрации 1, 2, 4%, хлороформа 5-10%, изопрофанола, бутанола в

концентрации 10-40%. Изоэлектрическая точка VCN была оценена электрофорезом в ПААГ. Было доказано, что изоэлектрические точки VCN 1 составляли  $pI = 6,8$ , а изоэлектрическая точка VCN 2 составляла 4,58.

Основываясь на нескольких биохимических характеристиках, полученных из этого исследования (молекулярная масса,  $pI$ , термостабильность, чувствительность к протеазе) VCN1 и VCN 2 следует считать бактериоцином класса II [16].

Известно, что бактериоцины проявляют разную активность в отношении грамотрицательных бактерий. Тем не менее, некоторые исследования уже сообщали об активности бактериоцина против этой группы бактерий [20].

Было показано, что подавление роста различных бактерий зависит от общего вида принадлежности к исследуемым бактериям, концентрации препарата и времени инкубации с частично очищенными антимикробными препаратами (АМП) [24]. Было исследовано сравнительное влияние АМП в отличие от эндемичных ЛАВ, изолированных из разных источников с антибиотиками, наиболее широко используемыми для лечения заболеваний человека. Показано, что штамм ЛАВ ингибирует рост патогенных бактерий с различной эффективностью и это зависит от источников выделения патогенов [10; 15].

Сравнение эффективности полученных бактериоцинов с антибиотиками позволяет предположить, что эти бактериоцины могут использоваться для длительного применения против различных этиологических антибиотикоустойчивых патогенов для профилактики/лечения инфекционных заболеваний в качестве альтернативы антибиотикам.

Таким образом его бактериоцины являются отличными кандидатами для разработки новых профилактических и терапевтических препаратов, способных дополнить или заменить обычные антибиотики.

### **1.3. Виды *Bacillus* в качестве потенциальных кандидатов пробиотиков для лечения грибковых инфекций**

Как правило, большинство микробов, продуцирующих биосурфактанты, являются обычными обитателями загрязненных углеводородами участков. Однако существует очень мало литературных источников, сообщающих о существовании биосурфактантов, продуцирующих микробы в ризосферной почве растений, участвующих в рекультивации загрязненной пестицидами сельскохозяйственной почвы и в общем благополучии растений, что указывает на необходимость дальнейших исследований. Всего двадцать три морфологически различных штаммы ризосферы были выделены и подвергнуты скринингу на получение биосурфактанта с помощью предварительных скрининговых анализов биосурфактанта. По результатам скрининга MS16 был выбран в качестве наиболее эффективного и потенциального продуцента биосурфактанта и идентифицирован как *Bacillus altitudinis* MS16. О продуцировании биосурфактанта свидетельствовало резкое снижение поверхностного натяжения (СТ) питательной среды с 72,8 до  $32,3 \pm 0,1$  мН/м после 48 ч инкубации с максимальным выходом 3,8 г/л. Биосурфактант проявлял превосходную эмульгирующую активность (E24) 95,4% и стабильность эмульсии 95,8% по отношению к сырой нефти после инкубационного периода 28 дней с поразительной стабильностью в широком диапазоне

температур (20 – 120 °С, по 30 мин каждая), рН (4 - 12) и солености (2 – 12% NaCl, вт/в). Полученный биосурфактант экстрагировали этилацетатом и подвергли композиционному анализу, выявившему, что он представляет собой смешанный липопептид. Кроме того, биосурфактант проявлял значительную противогрибковую активность, проявляя 42,8%-ное ингибирование в отношении *Colletotrichum gloeosporioides* с последующим 41,2%-ным ингибированием в отношении *Sclerotinia sclerotiorum*. Насколько нам известно, в исследовании впервые сообщается о способности продуцировать биосурфактант новой ризосферной бактерии *Bacillus altitudinis*.

Биосурфактанты - это биологически синтезированная гетерогенная группа поверхностно-активных молекул, состоящая из гидрофильных и гидрофобных фрагментов.

Амфифильная природа биосурфактантов существенно способствует снижению поверхностного и межфазного натяжения на стыке гетерогенной системы, отличающейся своей полярностью гидрофобных фрагментов и водородной связью. В последние годы микробные поверхностно-активные вещества привлекают большое внимание благодаря своим уникальным свойствам.

Такие свойства, как низкая токсичность, более высокая биodeградируемость, исключительная поверхностная активность в суровых условиях окружающей среды, низкое пенообразование, высокая эффективность и регенеративные свойства. Биосурфактанты широко изучаются для их разнообразного биотехнологического применения будь то в качестве эмульгаторов и стабилизаторов в пищевой промышленности, в качестве рецептур в косметической промышленности, в качестве биоконтрольного агента в сельском

хозяйстве или в процессе биодegradации и биоремедиации в системе охраны окружающей среды.

Широкий спектр применения и структурная гибкость биосурфактантов позволили получить более высокий статус по сравнению с токсичными химическими синтетическими поверхностно-активными веществами.

#### **1.4. Антимикотики природного происхождения**

Эти препараты были разработаны и внедрены в клиническую практику в начале 1950-х годов. Они оказывают преимущественно фунгицидное действие и относятся к природным антимикотикам. Среди антигрибковых препаратов полиены имеют самый широкий спектр активности. К ним чувствительны грибы родов *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Mucor*, *Paracoccidioides*, *Rhizopus*, *Sporothrix*, а также некоторые простейшие (амебы, трихомонады, лейшмании, трипаносомы). Активность полиенов в отношении плесневых грибов (дерматофиты, аспергиллы и др.) значительно ниже. Резистентность штаммов к этим препаратам связана с повышением содержания аналогов эргостерина в цитоплазматической мембране грибов. Устойчивость развивается медленно, но является перекрестной ко всей группе полиенов.

Амфотерицин В, амфоглюкамин и микогеπτин подавляют рост большинства возбудителей глубоких микозов (бластомикоз, кокцидиоидоз, криптококкоз, гистоплазмоз), не проникают через кожу и слизистые оболочки. Амфотерицин В следует назначать для лечения микозов невыясненной этиологии. Эти препараты довольно токсичны (повреждение почек), поэтому применять их следует с осторожностью. В

настоящее время широко используется липидный комплекс амфотерицина В (амфолип). Этот препарат малотоксичен так как благодаря прочной связи антимикотика с фосфолипидами уменьшается его негативное влияние на холестерин в мембранах клеток человека, поскольку активное вещество высвобождается только при соприкосновении с клетками грибов.

Нистатин, леворин и натамицин используют в основном для лечения кандидозов. Эти препараты обычно хорошо переносятся больными и имеют минимум побочных реакций. В настоящее время нистатин и леворин применяются относительно редко, что связано внедрением в клиническую практику новых эффективных противогрибковых средств.

## ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

Объектом исследования были дети в возрасте от 7 месяцев до 12 лет, которым был поставлен диагноз микроспория, находящиеся на лечении в Республиканском кожно-венерологическом диспансере г.Уфы. Микроскопическое исследование патологического материала проводили на нативных препаратах.

Сбор инфицированных волос с пораженных участков кожи головы у детей проводили в день поступления больного в стационар (РКВД г. Уфы). Практическая часть эксперимента была выполнена на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского Государственного Медицинского университета.

### 2.2. Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

1) Агар / Бульон Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия 2018г.).

Состав:

<b>Ингредиенты</b>	<b>М173 грамм/литр</b>	<b>М391 грамм/литр</b>
Мясной настой	300,00	300,00
Гидролизат казеина	17,50	17,50
Крахмал	1,50	1,50
Агар-агар	17,00	—

Приготовление:

1. Размешать 38,0 г порошка М173 или 21,0 г порошка М391 в 1000 мл дистиллированной воды.

2. Прокипятить до тех пор, пока не растворятся частицы.
3. Профильтровать через ватно-марлевый фильтр.
4. Автоклавировать при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин.

Агар Мюллера-Хинтона, используют для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом. Бульон Мюллера-Хинтона используют для определения МПК антибиотиков в отношении аэробных бактерий и для проведения тестов чувствительности с диском пропитанным антибактериальным препаратом в высокой концентрации (Bauer, 1966).

Контроль качества. Сыпучий желтого цвета порошок, плотность среды соответствует по плотности 1,7%-ному агаровому гелю (M173), среда светло-янтарного цвета, прозрачна. При 25°C водный раствор M173 имеет рН 7,3 ± 0,2, а водный раствор M391 имеет рН 7,4 ± 0,2, ростовые характеристики референс-штаммов через 18-24 ч при 37°C (Ericsson, Sherris, 1971).

2) *Агар/Бульон Сабуро («HiMedia», Индия 2018г.)*.

Состав:

<b>Ингредиенты</b>	<b>грамм /литр</b>
Пептический перевар животной ткани	5,00
Гидролизат казеина	5,00
Глюкоза	20,00

Приготовление:

1. Размешать 30,0 г в 1000 мл дистиллированной воды.
2. Прокипятить до тех пор, пока частицы не растворятся.
3. Профильтровать через ватно-марлевый фильтр.



4. Автоклавировать при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин.

Среда является модификацией прописи Сабуро. Рекомендуются для определения фунгистатической активности фармакологических препаратов. Среду используют для культивирования дрожжевых, плесневых грибов и ацидофильных бактерий. Гидролизат казеина и пептический перевар животной ткани – это источником питательных элементов, для того чтобы могли расти грибы и бактерии. Исследуемый продукт инкубируют при 22-25°C в течение 10 суток. Если получили аналогичный рост, то можно сделать вывод, что фунгистическое действие отсутствует. Продукт, обладающий фунгистатическим действием, используют большее соотношение среды и продукта или добавляют приемлемый стерильный компонент, инактивирующий это действие (Reeder, 1989).

## **2.3. Методы исследования**

### **2.3.1 Метод последовательных разведений суспензии бактерий**

Разведения готовили в стерильном мясопептонном бульоне (МПБ). В ходе опыта использовали один и тот же коэффициент разведения - 10, что уменьшает вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильный МПБ разлили по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой перенесли в пробирку с 9 мл стерильного МПБ – это первое разведение ( $10^{-1}$ ). Полученное разведение тщательно перемешали новой стерильной пипеткой, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Затем той же пипеткой отбирали 1 мл суспензии и переносили во вторую пробирку, получая второе разведение ( $10^{-2}$ ). Таким же образом готовили следующее

разведение ( $10^{-3}$ ). Для приготовления каждого разведения использовали новую пипетку.

### **2.3.2. Посев суспензий на агаризованную питательную среду Сабуро**

Перед посевом поверхностным способом разлили расплавленную агаризованную питательную среду в три стерильные чашки Петри по 15 мл в каждую. Чашки оставили на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом подсушили для удаления конденсационной воды.

В чашку Петри с подсушенной средой внесли точно измеренный объем 1 мл соответствующего разведения и распределили его стеклянным шпателем по поверхности среды. После посева чашки Петри поместили в термостат при температуре  $37^{\circ}$  крышками вниз.

Через неделю провели подсчет выросших колоний.

### **2.3.3. Подсчет выросших колоний бактерий на чашках Петри**

Колонии микроорганизмов подсчитывали через 5 суток инкубации. Подсчет проводили, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечали точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делили на секторы, просчитывали колонии в каждом секторе и суммировали результаты.

Лучшим разведением следует считать то, из которого при высеве в чашке Петри вырастает от 30-50 до 100-150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных

высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке.

#### **2.3.4. Приготовление сурфактанта**

Суспензии бактерий в исследуемых концентрациях (1:10, 1:100 и 1:1000) поместили в термостат при температуре 35°C на 48 час. Затем открутили на центрифуге 10000 об/мин в течение 20 минут. Фильтрат использовали для обработки инфицированных микроспорией волос.

#### **2.3.5. Обработка волос инфицированных микроспорией биосурфактантом (в разведении 1:10, 1:100, 1:1000)**

Патологический материал (волосы детей с диагнозом “микроспория”) фотографировали и помещали в эппендорфы с 0,5 мл раствора супернатанта *Bacillus altitudinis* в концентрациях 1:10, 1:100, 1:1000 в двух повторностях и инкубировали в течение 3 суток в термостате при температуре 36,6°C.

Для визуализации эффекта воздействия пробиотика применяли метод световой микроскопии. Волос после обработки бактериоцином помещали на предметное стекло, закрывали покровным стеклом, микроскопировали при увеличении 20× и фотографировали.

**2.3.6. Оценка бактериальной активности биосурфактанта, полученного из *Bacillus altitudinis*, на грибковую культуру *Microsporium spp.***

В чашку Петри с подсушенной средой внесли точно измеренный объем 1 мл биосурфактанта, полученного из *B.altitudinis*, в разведении 1:10 и распределили его стеклянным шпателем по поверхности среды. Инфицированные волосы поместили на агар. После посева чашки Петри выдержали в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 5 суток.

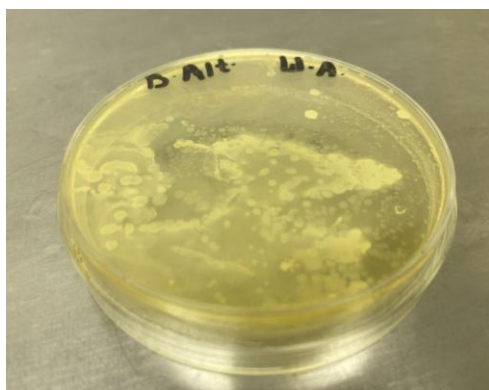
## ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Результат последовательных разведений суспензии бактерий

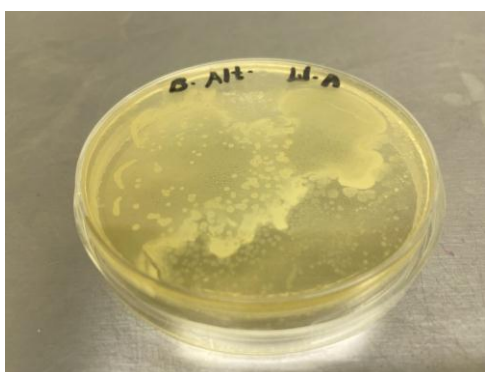


Рисунок 1- разведение культуры *Bacillus altitudinis* в жидкой питательной среде в соотношении 1:10, 1:100, 1:1000

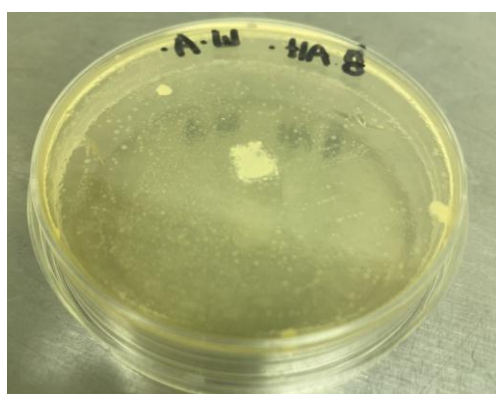
**3.2. Результат посева суспензий бактерий на агаризованную питательную среду Сабуро**



а



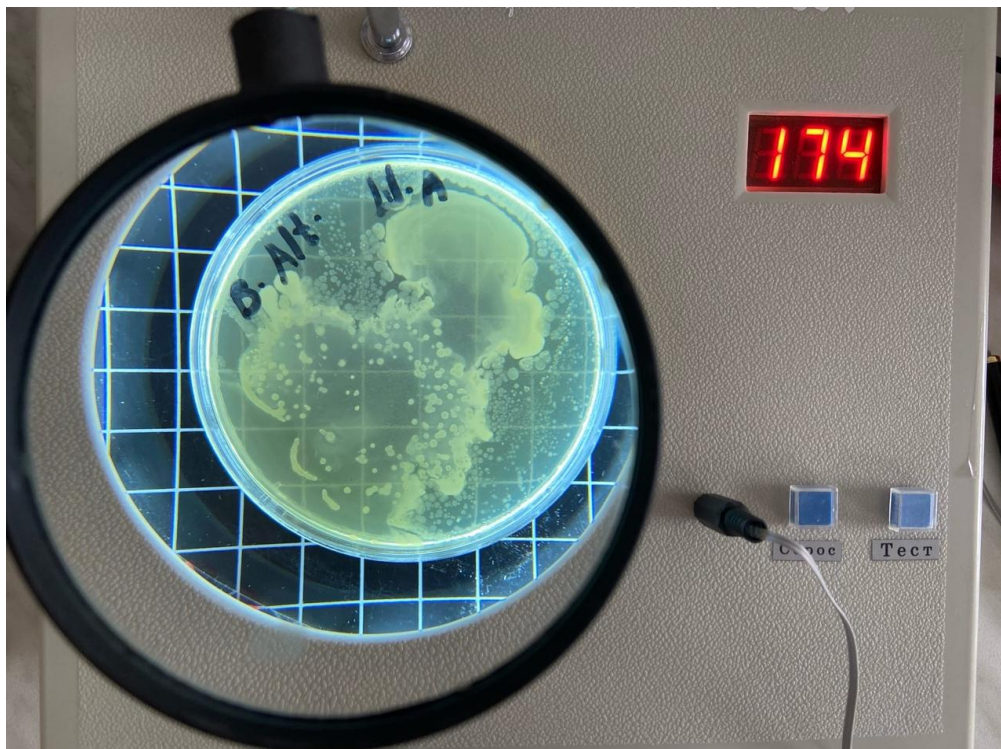
б



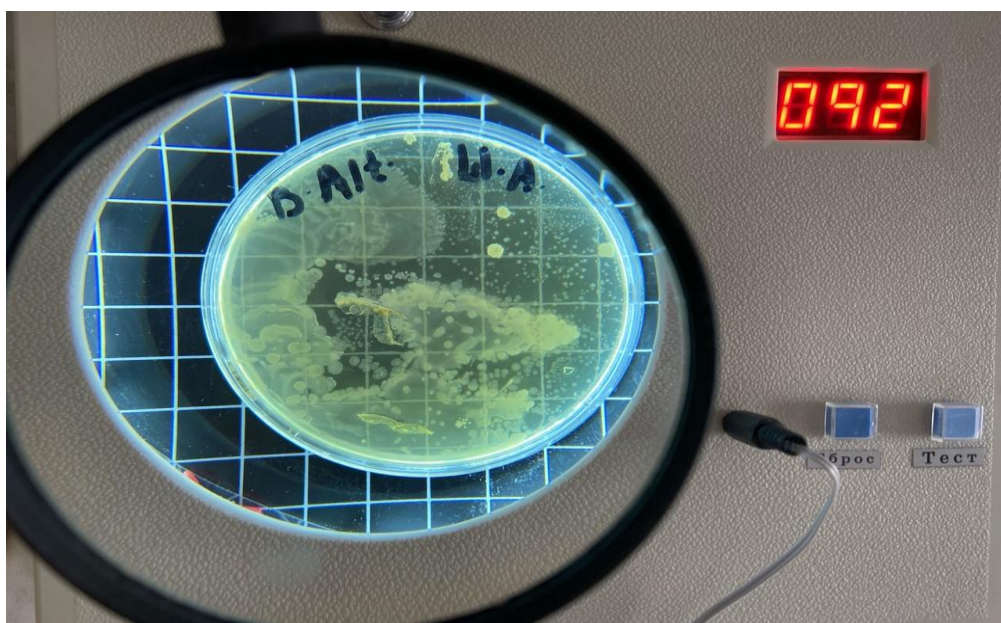
с

Рисунок 2- рост колоний *Bacillus altitudinis* при разведениях 1:10 (а), 1:100 (б), 1:1000 (с)

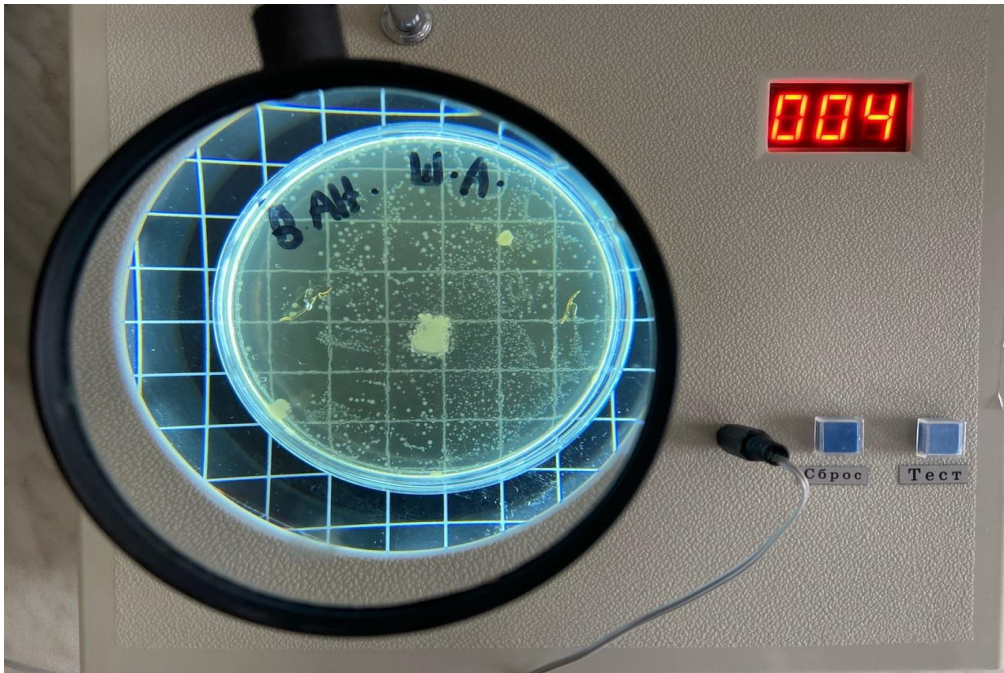
### 3.3. Определение количества колоний бактерий в исследуемых разведениях 1:10, 1:100, 1:1000



а



б



с

Рисунок 3 – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии *B. altitudinis* в разведениях 1:10 (а), 1:100 (б), 1:1000 (с) составляло 1740 КОЕ/мл, 920 КОЕ/мл, 40 КОЕ/мл соответственно

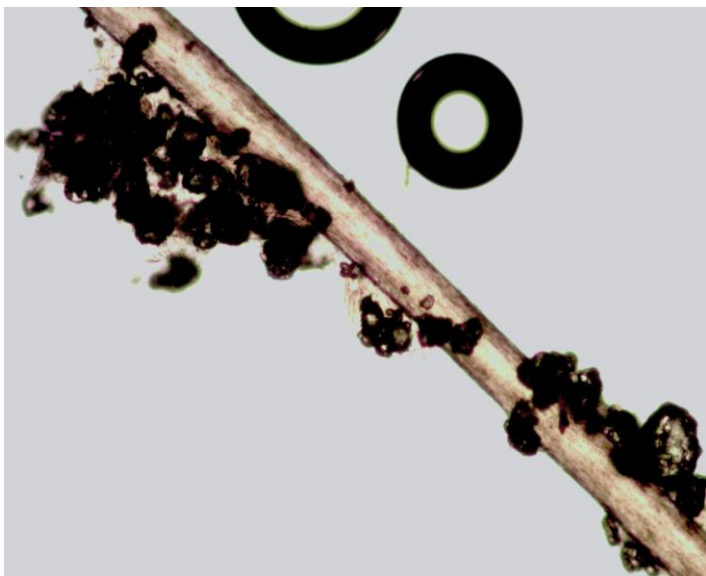


### 3.4. Результаты приготовления биосурфактанта

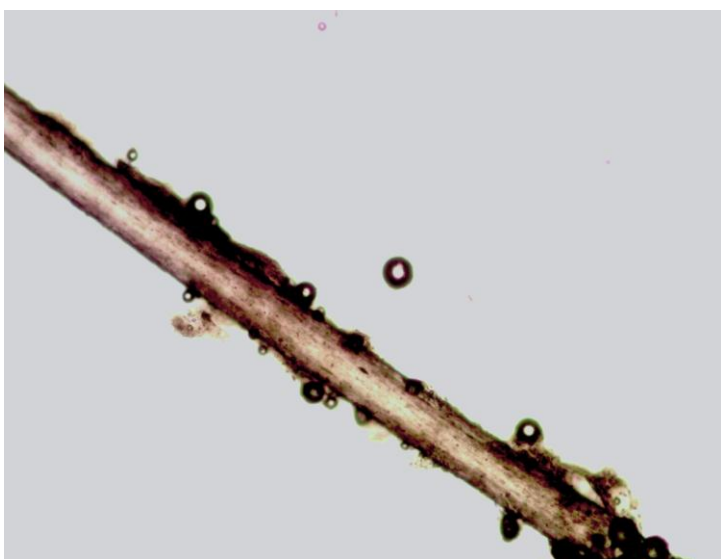


Рисунок 4 – биосурфактанты, полученные из суспензии бактерий *B. altitudinis*, в разведениях 1:10 (1740 КОЕ/мл), 1:100 (920/мл КОЕ/мл), 1:1000 (40 КОЕ/мл)

**3.5. Результаты обработки биосурфактантом (в разведении 1:10, 1:100, 1:1000) волос, инфицированных микроспорией**



а



б

Рисунок 5 – микрофотография волос, пораженных *Microsporum spp.*, до обработки (а) и после 3-суточной инкубации (б) в растворе биосурфактанта, полученного из суспензии бактерий, в разведении 1:10 с числом 1740 КОЕ/мл

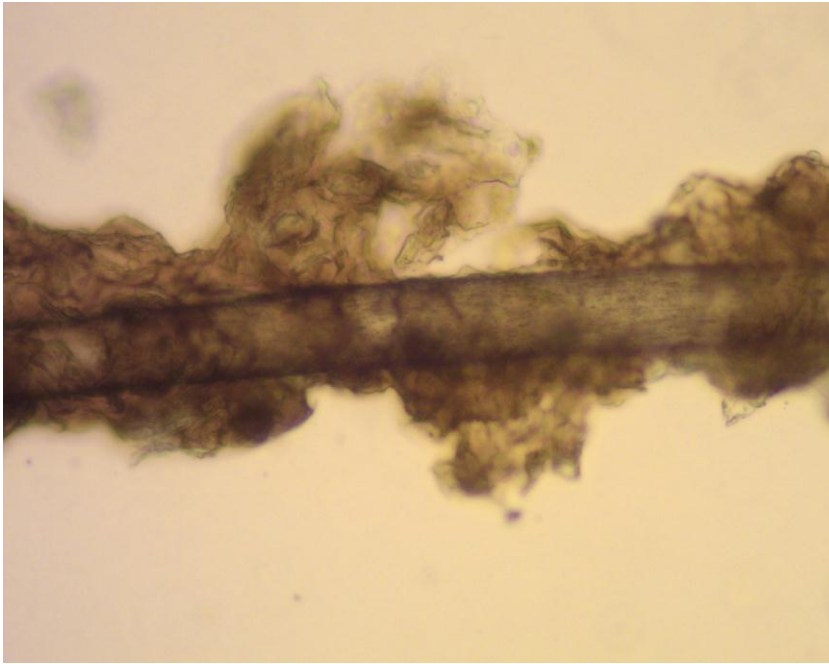


а

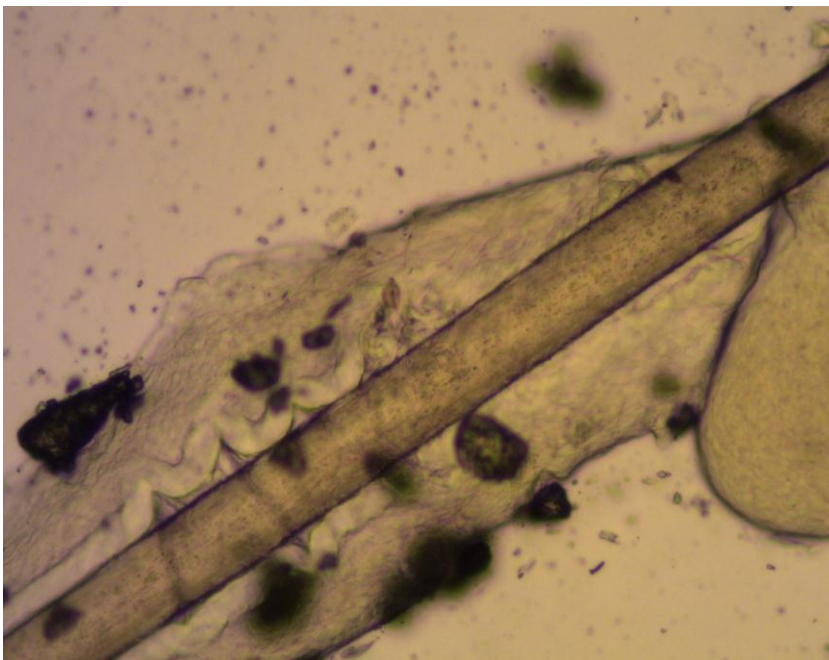


б

Рисунок 6 - микрофотография волос, пораженных *Microsporium spp.*, до обработки (а) и после 3-суточной инкубации (б) в растворе биосурфактанта, полученного из суспензии бактерий в разведении 1:100 с числом 920 КОЕ/мл



а



б

Рисунок 7 - микрофотография волос, пораженных *Microsporium spp.*, до обработки (а) и после 3-суточной инкубации (б) в растворе биосурфактанта, полученного из суспензии бактерий в разведении 1:1000 с числом 40 КОЕ/мл

**3.6. Оценка бактериальной активности биосурфактанта, полученного из *Bacillus altitudinis* на рост *Microsporium spp.***



а

б

Рисунок 8 - культура *Microsporium spp.*, без добавления биосурфактанта (а).

Влияние биосурфактанта 1:10 на рост *Microsporium spp.*, (б)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосурфактанты - это биологически синтезированная гетерогенная группа поверхностно-активных молекул, состоящая из гидрофильных и гидрофобных фрагментов.

Амфифильная природа биосурфактантов существенно способствует их способности снижать поверхностное и межфазное натяжение на стыке гетерогенной системы, отличающейся своей полярностью гидрофобных фрагментов и водородной связью. В последние годы микробные поверхностно-активные вещества привлекают большое внимание благодаря своим уникальным свойствам.

Такие свойства, как низкая токсичность, более высокая биodeградируемость, исключительная поверхностная активность в суровых условиях окружающей среды, низкое пенообразование, высокая эффективность и регенеративные свойства.

Таким образом, биосурфактанты являются отличными кандидатами для разработки новых профилактических и терапевтических препаратов, способных дополнить или заменить обычные антибиотики. Полученные биосурфактанты могут использоваться для длительного применения против различных этиологических антибиотикоустойчивых патогенов для профилактики/лечения инфекционных заболеваний в качестве альтернативы антибиотикам.

В нашем исследовании впервые сообщается о способности продуцировать биосурфактант новой ризосферной бактерии *Bacillus altitudinis*, обладающем фунгистатическим эффектом на грибковую культуру *Microsporium spp.*.

## Выводы

1. Фунгистатический эффект выявлен в суспензиях с количеством бактерий 1740 колониобразующих единиц (КОЕ/мл) (разведение 1:10) и 920 КОЕ/мл (разведение 1:100). Разведение 1:1000 с количеством 40 КОЕ/мл не проявило антимикотического воздействия.

2. Биосурфактант в концентрации 1:10 проявил больший эффект на состояние инфицированных волос после 3-х суточной инкубации в растворе по сравнению с биосурфактантом в разведении 1:100. Биосурфактант, полученный из бактерии 1:1000, не оказал антимикотического воздействия.

3. Доказаны фунгистатические свойства биосурфактанта, полученного из *Bacillus altitudinis*, на культуру *Microsporum spp.*

## Список использованной литературы

1. Васильева Н.В, «Задачи лабораторной диагностики микозов». Тезисы конференции «Лабораторная диагностика микозов». Москва. 2016 г.
2. Степанова Ж.В., Новоселов А.Ю., Воробьев И.А, и др. Результаты клинического изучения 1% крема «Тербизил» при лечении микозов гладкой кожи Concilium medicum. –Приложение «Дерматоневрология».-2004.-с.5-7.
3. Котрехова Л.П., Разнатовский К.И.Этиология, клиника, лечение дерматомикозов у больных сахарным диабетом. Проблемы медицинской микологии-2005.-Т.7, №4.-с.13-18.
4. Ресурсы и деятельность кожно-венерологических учреждений.
5. Заболеваемость за 2005—2006 гг. Статистические материалы. М2007; 115.
6. Дезинфектология организация и проведение дезинфекционных мероприятий при дерматомикозах. Методические указания МУ 3.5.2644-10.-2010.-с.1-2.
7. Нуралиев М.Д. Эпидемиология, особенности клиники и совершенствование терапии трихофитии в условиях жаркого климата: Автореф. дис.... канд. мед. наук. — Душанбе, 2007. — 20 с.
8. Медведева Т.В., Антонов В.Б., Леина Л.М. и др. Трихофития: современные представления об этиологии, клинической картине, особенностях диагностики и терапии // Клин. дерматол. и венерол. — 2007. — Т. 4. — С. 70–74.
9. Богуш, П. Н. Случай *Tinea capitis*, обусловленной антропофилом *Trichophyton violaceum* у ребенка из Эфиопии / П. Н. Богуш //



- Клиническая дерматология и венерология. – 2007. – №2. – С. 26-28.
10. Кашкин, П. Н. Практическое руководство по медицинской микологии / П. Н. Кашкин, В. В. Лисицин. – Л.: Медицина, 1983. – 192 с.
  11. Рациональная фармакотерапия заболеваний кожи и инфекций, передаваемых половым путем: Рук. для практикующих врачей / А.А. Кубанова, В.И. Кисина., Л.А. Блатун, А.М. Вавилов и др.; под общ. ред. А.А. Кубановой, В.И. Кисиной. М.: Литтерра, 2005; 882 с.
  12. Хисматуллина З.Р. Зооантропонозная трихофития в Республике Башкортостан (этиология, клиника, диагностика, лечение): дис.д-ра мед. наук. - Уфа, 2007. - 158с.ой, микроспорией, трихофитией и фавусом» 1995 г.
  13. Владимиров, В. В. Кожные и венерические болезни (атлас) / В. В. Владимиров, Б. И. Зудин. — М.: Медицина, 1982. — С. 252.
  14. Скрипкин, Ю. К. Кожные и венерические болезни / Ю. К. Скрипкин,
  15. А. Л. Машкиллейсон, Г. Е. Шарапова. — М.: Медицина, 1995.-С. 356.
  16. Сосновский, В. Т. Дерматологический справочник / В. Т. Сосновский, Н. З. Яговдик, И. Н. Белугина. — Мн.: Выш. шк., 2001. — С. 734.
  17. Адаскевич, В. П. Кожные и венерические болезни: учеб. пособие 2005
  18. В. П. Адаскевич, В. М. Козин. — М., 2006. — С. 229–231.
  19. Рукавишникова, В. М. Микозы стоп / В. М. Рукавишникова. — М.:
  20. Медицина, 2003. — С. 457.
  21. Родионов, А. М. Грибковые заболевания кожи / А. М. Родионов. СПб., 1997. — С. 237.
  22. Сергеев, А. Ю. Грибковые инфекции: рук-во для врачей / А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев. — М.: Медицина, 2004. — С. 511.
  23. Кожные и венерические болезни: рук-во для врачей: в 2 т.; под ред.
  24. Ю. К. Скрипкина. — М.: Медицина, 1999. — С. 880.

25. Allan L., Wiley-Blackwell Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology. 2016; 612.
26. X'Salton M., Kim K., Baron's Medical Microbiology, 1996.
27. Герчина Н.И., Бесчастнова Н.Ю., Крепкович Ю.А., Осипов Л.М., Сидельников А.С., Медицинский вестник. 2016; № 2 (81): 43-46.
28. Pollack M., Pseudomonas aeruginosa, in Principles and Practice of Infectious Diseases. 1995.
29. Naber K.G., Bishop M.C., Guidelines on the management of urinary and male genital tract infections. 2006.
30. Sobhy N. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus from skin and soft tissue infections 2012; 16(5):426-31
31. Агаджанян Н.А., Ушаков И.Б., Торшин В.И., Турзин П.С., Северин А.Е., Дубовой Л.И., Ермакова Н.В., Экология человека. 1997.
32. Fotadar U., Zaveloff P., Terracio L., "Growth of Escherichia coli at elevated temperatures". 2005; 45 (5): 403—4.
33. Воробьев А.А., Микробиология. 2004. 104-105.
34. Афанасьева В.М., Носов С.Д., Большая медицинская энциклопедия. 1979.
35. Ogston A.A., On Abscesses. Classics in Infectious Diseases. Rev Infect Dis. 1984; 6 (1): 122—28.
36. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H., Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. 1997; 10(3): 505—20.
37. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А., Микробиология. 1986.
38. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни. 2003.
39. Коротяев А.И., Бабичев С.А., Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 2008; 431—767.
40. Руднов В.А., Русский медицинский журнал. 2005; Том 13, № 7.

41. Kurahashi K.H., Kajikawa O.E., Sawa T.T., 1999; 104:743-50.4.
42. Roy-Burman A.T., Savel R.H., Racine S.2001; 183:1767-74.
43. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Махрова Т.В. Микробиология.2002.
44. Борисов Л.В. Микробиология.2005.
45. Kallen A.T., Guh A.T., United states centers for disease control and prevention issue updated guidance for tackling carbapenem-resistant enterobacteriaceae. 2012.
46. Roel M., Harten K.B., Rob J.L., Nathaniel I.M., Antoni P.A., Multidrug-Resistant Enterococcal Infections.2007;**25**:467-479.
47. Delcour T.T., Outer membrane permeability and antibiotic resistance. 2009; 808–816.
48. Braz J.M., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections.2012; 16(5):426-31.
49. Diaz-Guerra T.M., Mellado E.M., Cuenca-Estrella M.T., Rodriguez-Tudela J.L., A point mutation in the alpha-sterol demethylase gene *cyp5A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*.2003; 47:1120-1124.
50. Онищенко Г.Г. Методические указания МУК.4.2.1890-04; Клинический микробиал антимикроб химиотер. 2004;Том 6, № 4.
51. Поздеев О.К., Медицинская микробиология. 2001.
52. Vandepitte J.T., Engbaek K.C., Piot P.C., Neuck C.C., Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 1991.
53. Barry A.L., Thornsberry C.T., Diffusion test procedures. 1993.
54. Morrison G.H., Critical Reviews in Analytical Chemistry.1969; (14) 28A.



## СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.VUZ

Автор работы: Шаяхметова Анжелика Ильшатовна  
Самоцитирование рассчитано для: Шаяхметова Анжелика Ильшатовна  
Название работы: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВОЛОС, ПОРАЖЕННЫХ MICROSPORUM SPP, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИЛЬТРАТОВ ШТАММОВ-КАНДИДАТОВ В ПРОБИОТИКИ  
Тип работы: Выпускная квалификационная работа  
Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

### РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ	13.5%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	13.5%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	75.34%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85.28%
ЦИТИРОВАНИЯ	11.15%	ЦИТИРОВАНИЯ	1.22%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 15.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 15.06.2021 12:19

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 15.06.2021

*Справка выдана с отключением модуля библиографических списков*

ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России  
Подпись проверяющего  
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА



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

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

## РЕЦЕНЗИЯ

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

Шахметовой Анжелики Ильшатовны

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Морфологические изменения волос, пораженных *Microsporum spp.* при воздействии фильтратов штаммов-кандидатов в пробиотики.»

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

Полностью соответствует

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

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

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

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.

Освоены методы планирования и анализа

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.

Хороший уровень подготовки

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

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента

(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 могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

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

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

ис гбн лоб. геологич. расч. инст. ИГиГ УРЭМ РАН  
(Место работы, занимаемая должность)

Зайкина ЕА  
(Инициалы и фамилия)



## РЕЦЕНЗИЯ

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

Шаяхметовой Анжелики Ильшатовны

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Морфологические изменения волос, пораженных *Microsporum spp.* при воздействии фильтратов штаммов-кандидатов в пробиотики.»

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

Полностью соответствует

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

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

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

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.

Освоены методы планирования и анализа

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.

Хороший уровень подготовки

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

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента

(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 могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

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

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

(Место работы, занимаемая должность)

Профессор кафедры ФПМ БГМУ г.Б.и.

(Инициалы и фамилия)

А. Байжиев Андрей

Хамитович



## ОТЗЫВ

на \_\_\_\_\_ выпускную квалификационную работу \_\_\_\_\_ студента группы \_\_\_\_\_ Б-401А \_\_\_\_\_  
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Шаяхметовой Анжелики Ильшатовны  
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Морфологические изменения волос, пораженных *Microsporum spp.* при воздействии фильтратов штаммов-кандидатов в пробиотики.»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию  
Полностью соответствует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Тема работы актуальна так как на сегодняшний день биосурфактанты, продукты метаболизма определенных групп бактерий, являются отличной альтернативой для разработки новых профилактических и терапевтических препаратов, обладающих фунгистатическими свойствами

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. \_\_\_\_\_

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов БГМУ

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости). \_\_\_\_\_  
Работа выполнена в соответствии с требованиями  
(дополнительные сведения представлены на \_\_\_\_\_ листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Автором тема глубоко проработана, и глубоко изучена, заслуживает внимания результаты и обсуждения

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

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

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично при успешной сдаче  
Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:

Доцент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии  
ФГБОУ ВО БГМУ, к.б.н.

Фатхутдинова Римма Ахметовна  
(Фамилия, имя, отчество, должность)



Грашев  
(Подпись)