

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

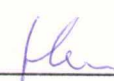
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ МЕДА IN VITRO»

Студент  Бичурина Лариса Александровна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Рецензент  Невитов М.Н.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.2021 № 14)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 23.06.21 № 4)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Мёд и его свойства	6
1.1.1 Химический состав мёда	7
1.1.2 Биологические свойства мёда	8
1.2 Антибактериальные компоненты мёда	9
1.2.1 Апидаецины	12
1.2.2 Абаецины	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	15
2.1 Материалы исследований	15
2.2 Этапы выделения пептидных фракций мёда	15
2.2.1 Тангенциальная ультрафильтрация	16
2.2.2 Ионообменная хроматография	18
2.2.3 Гель-фильтрация.....	19
2.2.4 Определение концентрации фруктозы реакцией Селиванова...	21
2.2.5 Определение концентрации белка методом Лоури.....	22
2.3 Оценка антибактериальной активности.....	23
2.3.1 Приготовление питательных сред	23
2.3.2 Работа с тестируемыми микроорганизмами.....	31
2.3.3 Микробиологический метод исследования.....	37
2.3.4 Оборудование, применяемое для исследований.....	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1 Результаты ионообменной хроматографии.....	40
3.2 Результаты гель-фильтрации	42
3.3 Результаты исследований антибактериальной активности	44
3.3.1 Результаты исследований антибактериальной активности меда.	44
3.3.2 Результаты исследований антибактериальной активности	

пептидных фракций меда	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	61

ВВЕДЕНИЕ

Мёд — это нектар, собранный с цветковых растений и обработанный ферментами головных желез медоносных пчел. Мёд известен как продукт с высокой питательной ценностью и целебными свойствами. Известно, что мёд обладает анксиолитическим, антибактериальным, иммуномодулирующим, антиоксидантным эффектами, обусловленными определенным компонентным составом, в том числе пептидами, обнаруженными в мёде.

Известно, что вещества пептидной природы обладают высокой биологической активностью, оказывают влияние на различные физиологические функции организма и находят применение в качестве лекарственных средств [20]. Действие таких препаратов построено на их работе в виде «своих эндогенных регуляторных молекул». Этим фактом объясняется отсутствие побочных эффектов и высокая активность уже в небольших концентрациях [14]. В том числе, известны пептиды с антибактериальной активностью и избирательным действием на бактериальные клетки.

Первый антибиотик пенициллин был открыт Флемингом в 1928 году. С тех пор было разработано множество лекарственных препаратов с антибактериальным действием [24,25]. Однако неконтролируемое применение антимикробных средств привело к снижению их эффективности и увеличению количества резистентных микроорганизмов. В связи с этим поиск новых веществ животного и растительного происхождения с антибактериальной активностью [19, 28, 36] и разработка на их основе лекарственных препаратов для клинического применения остаются актуальным направлением фармакологических, биохимических, микробиологических исследований.

Мёд и другие продукты пчеловодства, в том числе могут выступать в качестве сырья для получения антибактериальных препаратов пептидной природы [7].

Объектом исследования данной работы являются темный и светлый сорта мёда, собранные на пасеках Пензенской области: в Кузнецком районе, деревне Пенделка и Камешкирском районе, селе Болтино, а также пептиды, выделенные из этих сортов.

Предметом исследования являются антибактериальные свойства темного и светлого сортов мёда и пептидных фракций, выделенных из них.

Целью данной работы является исследование антибактериальной активности разных сортов меда и пептидных фракций *in vitro*.

В соответствии данной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Подготовить литературный обзор о компонентном составе меда, биологических свойствах и веществах с антибактериальной активностью в нем.
2. Выделить пептидные фракции темного и светлого сортов меда, используя методы ультрафильтрации, гель фильтрации и ионообменной хроматографии.
3. Исследовать антибактериальную активность различных сортов меда и пептидных фракций с помощью метода диффузии в агар, диско-диффузионного метода и метода серийных разведений в жидкой питательной среде.

Магистерская работа написана на 65 листах, содержит 22 рисунка, 8 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 52 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Мёд и его свойства

В последние годы неуклонно продолжает расти число сторонников апитерапии — направления медицины, в котором используются продукты пчеловодства для лечения различных заболеваний. Мёд — это натуральный продукт, который получается из цветочного нектара или из экссудатов растений медоносными пчелами. С давних лет он применяется человеком в качестве лекарственного средства и пищи [3]. Первые письменные упоминания о мёде датированы 2000—2100 годам до нашей эры и относятся к каменному веку [29]. В них говорится о его использовании в качестве лекарственного средства в виде мази [29]. Ранее упоминалось о мёде, как о важном источнике углеводов и уникальном свободно доступном подсластителе, до тех пор как производство промышленного сахара не заменило его [29].

Мёд пользуется большим спросом у человека из-за своих целебных свойств: как средство от ожогов, при лечении катаракты, язв, заживления ран, он обладает успокаивающим эффектом при применении на открытых ранах [31]. Мёд обладает высокой осмолярностью, раствор мёда не прилипает к раневым тканям, формирует влажную ранозаживляющую среду, которая препятствует росту бактериальных колоний. Таким образом, мёд снижает воспаление и уменьшает формирование экссудата более эффективно, чем стандартные методы лечения [31].

Состав мёда очень разнообразен и зависит:

- от цветочного источника;
- от внешних факторов: сезонных и экологических;
- факторов обработки.

1.1.1 Химический состав мёда

Натуральный мёд бывает двух видов: цветочный и падевый [18] и находит широкое применение в качестве продукта с целебными свойствами. Пчелиный мёд используют в качестве тонизирующего, противовоспалительного, противомикробного средства, оказывающего положительное влияние на обмен веществ, работу сердечно-сосудистой и нервной систем [39]. При простудных заболеваниях мёд используют в качестве жаропонижающего и потогонного средства, для восстановления сил.

Мёд незаменим для здоровья поскольку имеет в составе от 100 до 455 необходимых человеку веществ, в том числе сахаров, ферментов, минералов и витаминов [4,26].

Наличие легкоусвояемых углеводов обуславливает высокую питательность, другие вещества в составе обеспечивают гепатопротекторный эффект, повышение устойчивости организма к инфекциям.

Мёд богат минеральными компонентами в наиболее приемлемой для усвоения форме: макроэлементами калием, кальцием, магнием, натрием, серой, фосфором, хлором, микроэлементами железом, йодом, кобальтом, марганцем, медью, цинком, фтором и др. [30]. Мёд схож по минеральному составу с плазмой крови, что также приводит к его быстрому усваиванию [29].

В мёде содержатся многие водорастворимые витамины, такие как В1 (тиамин), В2 (рибофлавин), В5 (пантотеновая кислота), В6 (пиридоксин), В9 (фолаты), С (аскорбиновая кислота), РР, Н (биотин).

Натуральный мёд содержит около 1% азотсодержащих веществ, в том числе аминокислоты треонин, пролин, фенилаланин, метионин, глютаминовая кислот, лизин и белковые соединения: ферменты и гормоны.

Мед содержит около 0,3% органических (яблочная, муравьиная, уксусная, молочная, янтарная, лимонная, глюконовая и др.) и около 0,03%

неорганических (фосфорная и соляная) кислот, находящихся в свободном и связанном состоянии [35, 43].

Фитонциды в составе мёда, попадающие в него с нектаром и пыльцой медоносов, в том числе обуславливают его антибактериальные свойства

Цвет мёда зависит от красящих веществ, таких как каротин, хлорофилл, ксантофилл. Осенний мёд темный, а весенний светлый. Цвет мёда также зависит от меланоидинов, они образуются при нагреве и длительном хранении и обеспечивают приобретение тёмно-коричневой окраски [8].

Ароматические вещества мёда оказывают благоприятное воздействие на самочувствие человека, повышая аппетит и воздействуя на секреторную деятельность пищеварительных желез, способствуя улучшению пищеварения и усвоению пищи.

1.1.2 Биологические свойства меда

Мёд обладает разнообразными биологическими свойствами [2], оказывает положительное влияние на обменные процессы в организме человека:

- мёд оказывает оздоравливающее влияние на организм за счет уникального комплекса составляющих его веществ;
- сахара мёда оптимальны для применения в диетологии, употребление меда способствует снижению уровня холестерина в крови, расширению коронарных сосудов, уменьшению воспаления желудочно-кишечного тракта;
- регулярное употребление способствует укреплению мышечной и нервной систем, поднятию уровня гликогена в печени, усилению дезинтоксикационных функций, улучшению мочевыделения, через почки и кожу выводятся шлаки;
- мёд способствует улучшению ферментативной деятельности желудочно-кишечного тракта, белки с мёдом усваиваются на 14% лучше, мёд улучшает секреторную и моторную функцию желудочно-кишечного тракта: 12,5% раствор мёда стимулирует, а высокий % разведения тормозит;

- мёд сохраняет свойства продуктов длительно время, выполняя роль консерванта;
- мёд благотворно влияет на работу желез внутренней секреции и в целом на обмен веществ за счет богатого микроэлементного состава;
- происходит ощелачивание организма минеральными веществами меда при ацидозе;
- происходит активация кровеносной и нервной системы эфирами и смолистыми веществами меда, мёд помогает увеличить уровень гемоглобина, количества эритроцитов, усилить фагоцитоз;
- мёд обладает антиаллергическими свойствами в малых дозах;
- антимикробные свойства мёда очень велики [9], так как вследствие действия глюкозооксидазы на глюкозу образуется перекись водорода, убивающая микробов;
- мёд способствует усилению регенерации, обладает противоотёчным действием;
- мёд очень калорийный: в 100 г меда содержится 300-400 калорий, суточная доза меда –100-120 г;
- противогрибковое действие мёда;
- мёд обладает болеутоляющим действием, уменьшает возбудимость рецепторного аппарата периферической нервной системы и кожи, используется как отхаркивающее свойство;
- мёд применяется как противоядие при отравлении грибами и алкоголем.

1.2 Антибактериальные компоненты мёда

К факторам, отвечающим за антимикробную активность мёда относят: высокое значение осмолярности, содержание перекиси водорода, которая получается в результате окисления глюкозы при участии фермента глюкозооксидазы, когда происходит созревание мёда. Глюкозооксидаза

образуется в гипофарингеальных железах медоносных пчёл [47]. Если убрать перекись водорода путём добавления каталазы, мёд также будет обладать так называемой непероксидной антибактериальной активностью.

К непероксидным антибактериальным компонентам мёда принадлежат флавоноиды, фенольные кислоты и лизоцим [47]. Основой непероксидной антибактериальной активности могут быть вещества как животного, так и растительного происхождения. Непероксидная антибактериальная активность является термочувствительной и светочувствительной, не сохраняется при длительном хранении. Согласно ряду исследований, непероксидная антибактериальная активность является наиболее важной с точки зрения антибактериальных эффектов [42]. Это значит, что для обеспечения оптимальной антибактериальной активности, мёд необходимо хранить в холодном и огражденном от света месте и употреблять в свежем виде. По данным ряда исследований, мёд ингибирует вирус краснухи, три вида *Leishmania* и *Echinococcus* [50].

Существуют различия в антибактериальной активности у разных сортов мёда. Высокой антибактериальной активностью известен мёд *Manuka* (*Leptospermum scoparium*), родом из Новой Зеландии, из Восточно-Капской области Северного острова. Антибактериальный эффект обусловлен непероксидными компонентами, а именно фенольными соединениями в составе: метиловый эфир сиринговой и сиреновой кислот [49]. Еще одним примером мёда с высокой непероксидной антибактериальной активностью является австралийский мёд из тонкосемянника истодолистного [49], однако его точный химический состав еще не установлен.

Антибактериальные пептиды природного происхождения являются наиболее изучаемой группой пептидов в настоящее время. Они представляют собой катионные молекулы, которые встраиваются в мембраны бактериальных клеток и приводят к распаду липидной бислойной структуры [51]. Большинство антибактериальных пептидов амфипатричны, т.е. имеют

как гидрофильные, так и гидрофобные участки. Эти фрагменты способны связывать пептиды с липидными комплексами (гидрофобные участки) и фосфолипидами мембран (гидрофильные участки) [40].

При сниженных концентрациях часть антибактериальных пептидов подавляют рост бактерий за счет воздействия на процессы репликации и биосинтеза белка, не влияя на целостность мембраны. К примеру, буфорин II проникает в клетки и связывается с ДНК и РНК без вреда для клеточной мембраны [44]. Ещё примерами таких антибактериальных пептидов будут дрозацин, пиррокорицин и апидаецин. Такие антибактериальные пептиды имеют 18-20 аминокислотных остатков с активным центром для внутриклеточной мишени [32].

Доказано, что часть антибактериальных пептидов убивают резистентные к антибиотикам бактерии. Взять в основе низин – антибактериальный пептид и ванкомицин – антибиотик, они блокируют синтез клеточной стенки. Но резистентный к метициллину штамм *Staphylococcus aureus* резистентен к ванкомицину, несмотря на это он всё же чувствителен к низину.

У различных насекомых, в том числе пчел были обнаружены пептиды с антибактериальной активностью [36]. Инфицирование медоносных пчёл (*Apis mellifera*) живыми культурами *Escherichia Coli* приводит к максимальной продукции термостойких антибактериальных веществ. Такой гуморальный иммунитет встречается у разных насекомых, в том числе *Hydrophilus scaber* и у родственных молей [28], и у мухи *Surcouphagaperegrina* [28] и *Phormiuterranova* [31]. Антибактериальные вещества медоносных пчел имеют уникальную структуру в сравнении с изученными пептидными антибиотиками беспозвоночных и позвоночных.

1.2.1 Апидаецины

Апидаецины были выделены из лимфатической жидкости пчёл (*Apis mellifera*), представляют собой семейство индуцибельных пептидных антибиотиков с основной структурой: GNNRP (V/I) YTPQPRPPHPR (L/I) и высоким содержанием пролина (33%) [32]. В структуре выделяют консервативную область, отвечающую за общую антибактериальную активность, и вариабельную область. Термостойкие, не спиральные пептиды действуют на безграничный ассортимент бактериальных симбионтов и на группу человеческих бактериальных патогенов.

Апидаецины относят к гуморальным компонентам, появляющимся в лимфе пчелы в ответ на бактериальную инфекцию. Были выделены три близкородственных пептида: апидаецин Ia, Ib и II [16]. Такие катионные пептиды стабильны при сниженном значении кислотно-щелочного баланса равном 2 и высокой температуре в 100 °C. Присутствие 6 пролинов будет помогать данной стабильности. 3 апидаецина имеют практически одинаковое первичное строение с различиями в нескольких остатках. [48]. Главным образом большое содержание пролина (33%) обеспечивает уникальность структуры. Схожее строение свойственно цекропинам и части пептидных антибиотиков [37]. Апидаецины сохраняют клеточные мембраны, соответственно, апидаецины обладают бактериостатическим, а не бактериологическим эффектом, как предлагалось для аттацинов [29].

Прямое действие апидаецинов представляет медленное действие аттацинов, при котором отмечен скудный рост культуры *E. Coli* с задержкой на 1-2 часа [29]. Магаинины [31], цекропины и мелиттины [34] имеют литическую активность и нарушают мембранное строение клетки.

Апидаецины активны против грамположительных бактерий. Эти три разных апидаецина имеют одинаковую активность в отношении бактерий. Подразумевают, что пчелы применили систему защиты, специально нацеленную на микроорганизмы, с которыми они часто сталкиваются.

Сниженный уровень зрелых апидаецинов, с не обработанных преапидаецинов в лимфе пчелиных личинок указывает на снижение дипептидиламинопептидазы в личиночной лимфе. Отличие между иммунным ответом имагинального и преимагинального этапа связанных с социальным поведением, позволяющим личинкам пчел, в отличие от личинок одиночных насекомых, существовать в более защищенной среде.

Пониженная концентрация активных антибактериальных факторов в лимфе личинок пчёл нарушает эффективность их иммунной системы. Но личинок кормят рабочие пчелы, последние отбирают пищу в провисекулусе [39] и этим снижают риск инфицирования преимагинальных стадий.

Антибактериальное действие апидаецинов и их не токсичность по отношению к эукариотическим клеткам применяется у антибиотиков в лечении бактериальных инфекций животных или человека. Выделение и изучение апидаецинов, а также экспрессируемых их генов, позволит получить трансгенные сорта сельскохозяйственных культур, резистентных к болезнетворным бактериям.

1.2.2 Абаецины

Из медоносных пчел было выделено 4 индуцибельных антибактериальных компонента, названных абаецин. Абаецин – пептид, состоящий из 34 аминокислотных остатков, и включающий 10 остатков пролина - 29%, не имеет кислотных остатков и цистеинов. Сгруппирован суммарный заряд 4+ в положениях 12, 13, 27 и 29. Пролин одинаково расположен по всей длине, минуя α -спиральную конформацию [32]. Такие пролины периодичны и выравниваются изнутри. Поиск в базе данных NBRF последовательности белков (Washington, DC) не обнаружил совпадения с известными белками. В основе поиска выявили белки богатые пролином – коллаген. По контролю совпадений видно, что они имеют случайный характер. Также выделили похожие с последовательностями другие

антибактериальные пептиды, это абаецин, апидаецин и диптерицин А [33], [48]. Диптерицин А намного длиннее других. Непосредственное действие апидаецина связано с замедленной работой абаецина и диптерицина [28].

Апидаецины— селективно бактерицидные для грам «-» бактерий, а абаецины— умеренно бактерицидные в отношении многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. Апидаецины в 200 раз активнее в отношении *Agrobacterium*, *Erwinia* и *EscherichiaColi*.

Абаецин отличается медленной антибактериальной активностью от апидаецина. Учитывая гипоаллергенное строение, апидаецин или абаецин могут быть литическими пептидами, действуя на клеточные стенки губительно. Притом, каталитическая активность гликозидгидролазы лизоцима уже присвоена Glu и Asp остаткам, находящемся в каталитическом сайте [30], одни из тех что отсутствуют в последовательностях апидаецина и абаецина. Абаецин теряет бактерицидную активность, находясь в фосфатно-буферных солевых растворах, разведенной пчелиной лимфе и средах напоминающих ее физиологическую среду.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

Выделение пептидных фракций из мёда разных сортов и исследование антибактериальной активности мёда и пептидных фракций проводилось на базе кафедры «Общая биология и биохимия» Пензенского государственного университета и на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ «Кузнецкой межрайонной детской больницы».

В качестве объекта исследования были выбраны темный и светлый сорта мёда, собранные в 2019-2020 годах на пасеках Пензенской области. Темный мёд (гречишный) происхождением из Пензенской области, деревни Пенделка, Кузнецкого района, а светлый сорт мёда (цветочный) из Камешкирского района, село Болтино. Хранился мёд при комнатной температуре в герметично закрытой таре, в темном месте.

В ходе исследований определяли антимикробную активность мёда и пептидов *in vitro* по отношению к грамотрицательным и грамположительным культурам бактериям следующих штаммов: *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*.

2.2 Этапы выделения пептидных фракций мёда

Процесс выделения пептидных фракций мёда можно описать в виде цепочки этапов:

I этап: приготовление исходного раствора и грубая очистка;

II этап: сепарация;

III этап: очистка от углеводов;

IV этап: очистка и концентрирование;

V этап: аналитический этап, выделение особых пептидных фракций.

В данной работе на этапе сепарации производилось разделение компонентов на фракции по молекулярной массе методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке жидкости через высокоселективную мембрану.

На следующем этапе проводили ионообменную хроматографию. Разделение происходило за счет ионных взаимодействий между заряженными пептидами и функциональными группами носителя, при этом параллельно разделили пептиды на анионные и катионные для упрощения исследования [45].

Метод гель-фильтрации на сефадексе G-25 позволил очистить пептиды от низкомолекулярных компонентов буферных растворов. Концентрирование происходило путем лиофилизации.

2.2.1 Тангенциальная ультрафильтрация

Для разделения полученного раствора мёда по критерию молекулярной массы на фракции провели тангенциальную ультрафильтрацию раствора.

Ультрафильтрация — процесс мембранного разделения жидкости через полупроницаемую мембрану под давлением [5].

Система из полупроницаемой мембраны Vivaflow и перистальтического насоса MasterFlex обеспечивает проведение ультрафильтрации раствора в тангенциальном потоке. В итоге достигается, во-первых, сепарация раствора по критерию молекулярной массы, во-вторых, очистка раствора пептидов от белков и других биологически активных высокомолекулярных соединений: ДНК, РНК, а также концентрирование последних.

На рис. 1 схематично изображена установка для ультрафильтрации, позволяющая отфильтровать водные растворы объемом от 100 мл до 5 л.

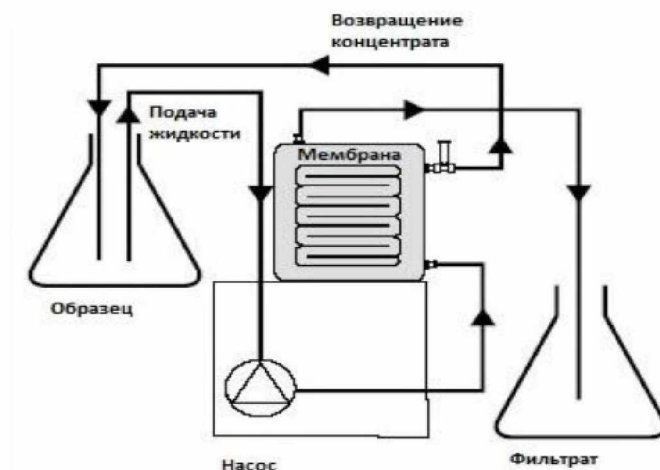


Рисунок 1. Схематическое изображение установки для ультрафильтрации

Перед непосредственным использованием мембраны для ультрафильтрации её необходимо правильно подготовить — очистить от остатков прежних filtrаций путём пропускания через неё сначала дистиллированной воды, а затем сменить раствор для промывки на 0,5 нормальный раствора гидроксида натрия, приблизительно три четверти объема, для омыления трудно отмываемых частиц. Последний шаг — повторная промывка дистиллированной водой и трубки мембраны и трубок для удаления от всевозможных примесей.

После подготовки в резервуар помещается определенный объем 75% раствора мёда, запираются клапаны на крышке, и приводится в действие перистальтический насос. Для эффективного соотношения скорости потока и давления, создающегося в мембране, необходимо поддерживать последнее па значениях порядка 3 Бар, не допуская его значительного снижения, что приводит к уменьшению скорости потока и увеличению времени фильтрации. После снижения объема разделяемого раствора до 50-70 мл фильтрация прекращается и мембрану отмывают от загрязнений по приведённой выше схеме.

Для приготовления 75% раствора мёда в колбе растворяли 375 г мёда в воде и добавляли воду до объема 0,5 л, и для очистки от грубых примесей и

загрязнений фильтровали под вакуумом через воронку Бухнера через фильтр «Красная лента» размер пор 8-12 мкм (рис.2).



Рисунок 2. Фильтр «красная лента»

2.2.2 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография — способ разделения и очистки молекул, применяемый для очистки и выделения белков и других заряженных молекул из различного по составу и происхождению биологического материала [16].

В основе метода лежит способность молекул диссоциировать в подвижной фазе хроматографической системы на катионы и анионы, где они, проходя сквозь сорбент, электростатически взаимодействуют с ионогенными группами последнего и задерживаются в неподвижной фазе [10, 22].

Первоначальная стадия работы с ионообменной хроматографией — подбор правильного ионообменника. Они различаются по химической природе ионогенной группы и материалу носителя, к которым «пришиваются» эти функциональные группы. Ионообменники делятся на аниониты и катиониты, несущие, соответственно, положительно или отрицательно заряженные после диссоциации функциональные группы. Выбор ионообменника также зависит и от типа буферных систем, с которыми будут работать на нём; тип буферных систем определяется природой разделяемого белка и зависит от изоэлектрической точки pI [17]. При этом руководствуются следующим правилом: при значении pH системы

выше изоэлектрической точки белок будет заряжен отрицательно, а при pH ниже — положительно. Изоэлектрическая точка пептидов, существующих в мёде, неизвестна, поскольку не существует литературных данных о пептидном составе мёда, поэтому разделение и выбор буферных растворов велось в соответствии с рекомендациями производителя сорбента [1, 21].

Разделение раствора пептидов мёда осуществлялось на стеклянной колонке размером 1,6×8 см, заполненной КМ-целлюлозой объёмом 5 мл. У ионообменников на базе целлюлозы количество связавшегося белка прямо пропорционально размеру белковых молекул, а значит, чем меньше молекулы белка, тем больше будет их адсорбция.

На хроматографическую колонку наносили 0,2 мл раствора мёда, содержащего молекулы с массой до 10 кДа, который получили способом ультрафильтрации. Элюцию проводили ступенчатым градиентом следующими буферными растворами: 0,2 М Na ацетатный, pH = 4,2; 0,2 М трис-HCl, pH = 9 [41]. Фракции собирали объёмом 1,5 мл, скорость элюции 1,5 мл/мин.

После сбора первых 8 фракций (суммарный объём элюции 12 мл), элюцию прекращали. Верхний слой начального 0,2 М Na-ацетатного буферного раствора с pH 4,2 заменяли на десорбирующий — 0,2 М трис-HCl (pH = 9) собирали еще 12 фракций.

Контроль выхода пептидов с колонки осуществляли методом Лоури. Фракции, в которых было зарегистрировано максимальное присутствие пептидов, сливали в одну и обессоливали методом гель-фильтрации.

2.2.3 Гель-фильтрация.

Для очистки полученных после ионообменной хроматографии фракций от низкомолекулярных примесей (соли буферных растворов, оторвавшиеся ионогенные группы целлюлозы и т. п.) использовали метод гель-фильтрации, принцип которого заключается в использовании особых гелей на основе

сефадексов — полимерных гранул, имеющих определённый размер пор, избирательно пропускающих через себя молекулы и частицы с определённой молекулярной массой.

Для подготовки геля сефадекс G-25 суспендируют в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляют набухать в течение 3 часов. После перемешивания до однородной массы гель оставляют для отстаивания. С основной осевшей массы геля декантируют надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул. Суспендирование с декантацией для очистки геля осуществляют 3-4 раза.

Для заполнения колонку размером 20x1,5 см закрепляют вертикально, закрывают нижний конец пробкой с фитингом, располагают в основание колонки кружок фильтровальной бумаги с подходящим диаметром. Далее в колонку наливают до 2 мл воды для заполнения фитинга, и по стенке колонки заливают суспензию геля через воронку. Открывают зажим колонки, дают раствору вытечь, не допуская высыхания столба геля. Суспензию геля добавляют до тех пор, пока высота столба геля в колонке не будет необходимого уровня, при этом верхняя граница геля должна быть горизонтальна. Затем на поверхность геля кладут кружок фильтровальной бумаги подходящего размера для предохранения уровня геля от колебаний при элюции или нанесении пробы. Колонку, наполненную гелем, уравнивают дистиллированной водой.

Для очистки полученных фракций пептидов мёда после ионообменной хроматографии от низкомолекулярных примесей и загрязнений на колонку, заполненную сефадексом G-25, наносят очищаемый раствор в объёме 0,5 мл и элюируют дистиллированной водой, собирая фракции объёмом 1,5 мл. Контроль выхода пептидов с колонки осуществлялся с помощью метода Лоури.

Предельная концентрация пептидов в полученных растворах составила $50 \pm 7,4$ мкг/мл. Для концентрирования пептидов использовали метод

лиофилизации с помощью лиофильной сушки VaCo 2. Для этого пробы замораживались при -80°C 24 часа, непосредственно сушка происходила в вакуумной камере до получения сухого остатка. Остаток растворяли в дистиллированной воде. Таким образом, концентрация пептидов в итоговом растворе составила 395 ± 15 мкг/мл.

2.2.4 Определение концентрации фруктозы реакцией Селиванова

Метод основан на образовании окрашенного продукта реакции фруктозы и резорцина при инкубации на кипящей водяной бане в присутствии сильной неорганической кислоты. Определение концентрации или наличия фруктозы в пробе свидетельствует о качестве разделения раствора мёда или перги, т. к. фруктоза является рядов компонентом углеводного состава соответствующего продукта.

Определение концентрации фруктозы проводилось следующим образом: из каждой фракции или пробы отбиралась аликвота в 0,5 мл, к которой добавляли 0,1%-й спиртовой раствор резорцина и 1,5 мл 30%-й серной кислоты, после чего проба инкубировалась на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 490 нм с длиной оптического пути 1 см, в качестве контроля использовали холостую пробу с дистиллированной водой вместо исследуемого раствора. Точное определение концентрации проводили по методу калибровочной прямой с использованием стандартных растворов фруктозы.

2.2.5 Определение концентрации белка методом Лоури

Для количественного определения содержания белка во фракциях после ионообменной хроматографии использовался метод Лоури, основанный на реакции ионов меди Cu^{2+} с пептидной связью. При этом медь переходит в Cu^{+} и реагирует с реактивом Фолина-Чокальтеу (фосфомолибденовая кислота и фенол), образуется нестойкий продукт, переходящий в молибденовую синь, максимум абсорбции которой наблюдается при $\lambda = 750$. При этой длине волны увеличение концентрации белка зависит линейно от показателя оптической плотности. Чувствительность метода высокая (адекватные значения наблюдаются для концентраций белка от 10 до 100 мкг/мл).

Из каждой фракции отбиралась аликвота объемом 0,5 мл, к аликвоте прибавлялся реактив С в количестве 1 мл (реактив С представляет собой смесь реактива В (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия) и А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), пробирка перемешивалась и смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее добавлялся реактив Фолина-Чокальтеу в количестве 100 мкл, после чего смесь снова интенсивно перемешивалась и далее инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 минут. Измерение оптической плотности проводилось на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 750$ нм. По полученным значениям оптической плотности была определена концентрация белка в каждой пробе с помощью градуированного графика, построенного с использованием БСА.

2.3 Оценка антибактериальной активности

2.3.1 Приготовление питательных сред

При выращивании культур микробов готовили определенные агаровые среды (таблица 1) [19]:

- агар с питательными свойствами для выращивания микробов сухой (ГРМ-агар), производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск;
- агар с питательными свойствами для обнаружения энтеробактерий сухой (АГАР ЭНДО-ГРМ), производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск;
- агар с питательными свойствами для изучения энтеробактерий сухой (Агар КЛИГЛЕРА-ГРМ), производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск;
- агар с питательными свойствами для обнаружения стафилококков сухой (СТАФИЛОКОКК-АГАР), производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск;
- агар с питательными свойствами для определения чувствительности микробов к антибактериальным препаратам сухой, производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск;
- хромогенный агар с питательными свойствами для выращивания колиформных бактерий и *Escherichia coli*, сухой (ХРОМАГАР), производитель HiMedia Laboratories [19].
- агар висмут-сульфит для выделения сальмонелл (ГРМ-агар), производитель ФБУН ГНЦ ПМБ город Оболенск.

Таблица 1 — Предназначение и приготовление питательных сред

Название среды	Предназначение	Суть метода	Аналитика характеристики	Образцы	Приготовление питательных сред
1. Агар с питательными свойствами для выращивания микробов сухой (ГРМ-агар)	«ГРМ-агар» используют для выращивания микробов: энтеробактерий, синегнойной палочки, стафилококков, для изучения исследований клинической микробиологии.	Выращивание микробов на плотных питательных средах с помощью микробиологического метода. Суть анализа — визуальный рост культур в виде определенных колоний на плотном слое питательной среды.	На чашках с «ГРМ-агаром» будет рост: культуры <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> с образованием синезеленого пигмента, через 18-20 ч после термостатирования при $t (37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ если внести 0,1 мл микробную взвесь, равной 10 единицам по стандарту мутности (ОСО 42-28-85 П).	Образцы исследований в клинической микробиологии	Содержимое размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до расплавления агара, фильтруют через фильтр, разливают в стерильные флаконы, стерилизуют в автоклаве при $t 121^\circ\text{C}$, 15 мин. Охлаждают до $t ^\circ 45-50 ^\circ\text{C}$, разливают в стерильные чашки Петри слоем 4-6 мм. Чашки подсушивают 30- 40 минут.

Таблица 1 — Продолжение

2. Агар с питательными свойствами для обнаружения энтеробактерий сухая (АГАР ЭНДО-ГРМ)	«Агар Эндо-ГРМ» нужен для микробиологических исследований при диагностике инфекционных заболеваний «in vitro».	Все компоненты, находящиеся в составе набора, обеспечивают питательность для роста бактерий, дифференциальной диагностики микроорганизмов.	«Агар Эндо-ГРМ» образует на посеянных чашках Петри рост культур колоний <i>E. coli</i> — круглые, малинового цвета с металлическим блеском, диаметром 2,0-3,0 мм.	Образцы исследованы в клинической микробиологии	Агар в определенном количестве, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2-3 мин до расплавления агара, фильтруют через фильтр, опять кипятят, охлаждают до $t\ 45-50^{\circ}\text{C}$ и разливают в чашки Петри слоем 5-6 мм. После застывания подсушивают. Готовая среда прозрачная, розового цвета. Используют ее в день приготовления. Хранят в темноте!
--	--	--	---	---	--

Таблица 1 — Продолжение

3. Агар с питательными свойствами для изучения энтеробактерий сухой (Агар КЛИГЛЕРА-ГРМ)	Служит для бактериологического анализа в клинической микробиологии для изучения энтеробактерий по их способности ферментировать лактозу, глюкозу, выделять газ и сероводород при диагностике инфекционных заболеваний «invitro».	Все компоненты, находящиеся в составе набора, обеспечивают питательность для роста бактерий, идентификацию по биохимическим свойствам микробов.	Агар Клиглера образует рост культур Escherichia Coli, они ферментируют лактозу, глюкозу с образованием газа, не образуют сероводород. Pseudomonas Aeruginosa не ферментирует лактозу, глюкозу, газа не образует, не образует сероводород.	Образцы исследованы в клинической микробиологии	Препарат размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2-3 мин, фильтруют через фильтр наливают в пробирки по 7 мл, стерилизуют в автоклаве при t 112 ° С 20 мин. Среда скашивают столбиком, h 25-30 мм. Среда будет красного цвета. Используют в течение 3-х недель при t 2-8 °С или в течение 3 суток при t хранения 18-25 °С, хранится в темноте.
---	--	---	---	---	---

Таблица 1 — Продолжение

4. Агар с питательными свойствами для обнаружения стафилококка в сухой (СТАФИЛОК ОКК-АГАР)	Стафилококкагар служит для обнаружения стафилококка из исследуемого материала.	Все составляющие среды способствуют росту требовательных к соли микробов и подавляет рост сопутствующей флоры.	Присутствие бледно-желтых, непрозрачных, выпуклых, круглых с ровными краями блестящих колоний, диаметром 2,0-4,0 мм, говорит о наличии <i>Staphylococcus Aureus</i> .	Образцы исследованы в клинической микробиологии	Агар перемешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят около 3 мин до расплавления агара, фильтруют и стерилизуют в автоклаве при $t\ 121\ ^\circ\text{C}$ 15 мин. Остужают до $t\ 40^\circ\text{-}45^\circ\text{C}$, разливают по 5-6 мм в стерильные чашки. Как застынут чашки, их подсушивают при $t\ 37^\circ\text{C}$ около 40-60 мин. Среда в чашках прозрачная, желтого цвета, pH 7,2. Используют в течении 15 суток, при $t\ 2\text{-}8\ ^\circ\text{C}$.
--	--	--	---	---	---

Таблица 1— Продолжение

5. Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая	Среда служит для определения чувствительности микробов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным способом при анализе микробиологических исследований в клинической микробиологии	Результат анализа в виде образования зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами чувствительными микробами и их регистрацией диаметра зон.	Агар образует рост тестируемых культур: Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa, Salmonella Enteritidis в виде газона с образованием соответствующих диаметров зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами через 18-20 ч термостатированных высевок при t 37 ° С.	Образцы исследованы в клинической микробиологии	Агар размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2 мин, разлить по флаконам и стерилизовать при t 121° С в автоклаве 15 мин. Охладив до 45-50°С разлить по 20 мл в стерильные чашки Петри, d 90 мм и по 25 мл в чашки d 100 мм, на горизонтальной гладкой поверхности. Зоны задержки роста зависят от толщины слоя, однородности разлитого агара. Срок хранения при 4-8°С 7-10 суток.
--	---	--	---	---	---

Таблица 1 — Продолжение

6.Хромогенная питательная среда для обнаружения колиформных бактерий и Escherichiacoli, сухая (ХРОМАГАР)	Агар служит для ускоренного одновременного определения общих колиформных бактерий и E.Coli в испытуемом образце.	Суть действия хромогенного агара - выделение ферментов галактозидазы колиформных бактерий; глюкуронидазы и триптофаназы E.coli.	В результате выявления и подсчета по характеру окрашенных колоний в определенный цвет. На агаре E. Coli образуют синие колонии, другие (фекальные) колиформные микробы образуют красные колонии, и другие грамотрицательные колонии будут бесцветны.	Исключительно для In vitro диагностики.	Растворить 26,5 г в 1 литре дистиллированной воды, нагревая на кипящей водяной бане, перемешивая содержимое до растворения около 35 минут. Автоклавировать нельзя! Не перегревать! pH: 6,8±0,2 при 25°C
--	--	---	--	---	---

Таблица 1 — Продолжение

7. Агар висмут-сульфит для выделения сальмонелл(Г РМ-агар)	Агар для обнаружения сальмонелл из материала	Суть действия хромогенного агара основан на ингибирующем воздействии на сопутствующие коли морфные микроорганизмы.	Бактерии, источники сероводорода, будут черными, может с коричневым или зеленым оттенком. Время почернения сальмонелл – 18 часов. Иногда имеют металлический отблеск, который проявляется через 48 часов от начала инкубации.	Образцы исследований в клинической микробиологии и	Агаррастворить в 1 литре воды, перемешать, прокипятить 3 минуты, до расплавления агара. Охладить и разлить по чашкам Петри. Чашки подсушить. Готовая среда мутновато зеленого цвета, использовать в течение 3 дней. Не автоклавировать.
--	--	--	---	--	---

2.3.2 Работа с тестируемыми микроорганизмами

В основе исследования на антимикробную активность применяли определенные тестируемые культуры.

В ходе приготовления исследуемых культур производили посевы из субкультуры референтного образца. Контрольный штамм отивали со среды, на которой он хранился, на плотные неселективные питательные среды, с определенной питательностью для определенных микробов, делали 1 пассаж. Затем все посевы убирали в термостат при заданной t° . Если посевы на плотных питательных средах не дали роста, их пересевали на жидкие питательные среды (рис. 3). Микробы после 1 пассажа были с низкой жизнеспособностью, и поэтому брали культуры 2 или 3 пассажа для рабочих культур.

Схема бактериологического анализа

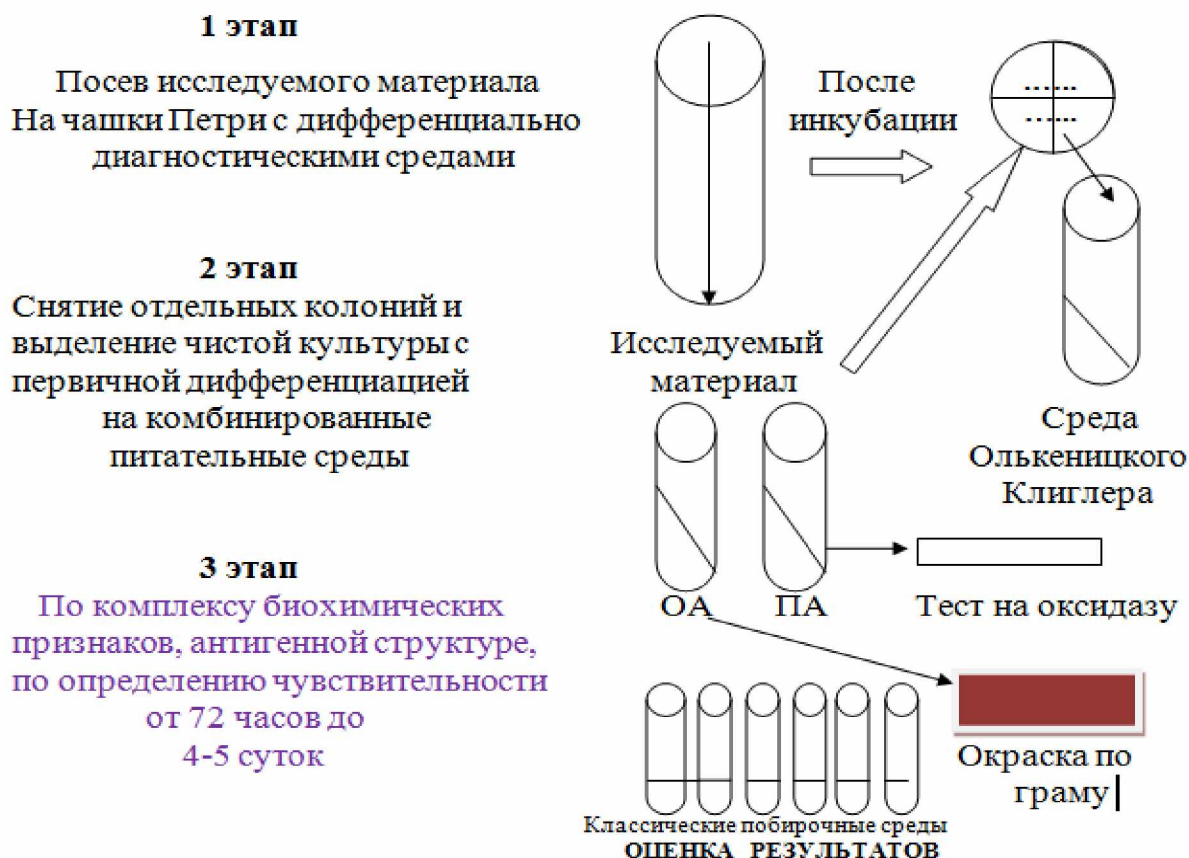


Рисунок 3.Схема бактериологического анализа

Контрольные образцы обязательно исследовали на чистоту роста. Если происходила контаминация, убивали субкультуру референтного образца. Тестируемые штаммы микроорганизмов хранили при температуре 5°C в лиофилизированном состоянии или под слоем вазелинового масла [13].

Исходный инокулят готовили по стандарту мутности или по спектрофотометру, который был в лаборатории в концентрации 10^8 или 10^9 КОЕ/мл. К ним относятся:

- отраслевой стандарт мутности в соответствии ОСО-42-28-85П производства ФГУН им. Л. А. Тарасевича. Мутность стандарта составляла 10 единиц, эквивалентна концентрации клеток в 1мл: $0,93 \cdot 10^9$ КОЕ/мл микробов кишечной палочки, то есть микробов по размерам, равным размерам кишечной палочки [43].

- стандарт МакФарланда (McFarland).

В коммерческие стандарты МакФарланда входили латексные частицы, суспендированные в особом буферном растворе в количестве, который обеспечивал прохождение волны света длиной 600-650 нм (таблица 2).

Таблица 2– Стандарт МакФарланда (McFarland)

Стандарт МакФарланда	Количество микробных клеток при плотности инокулянта $\cdot 10^8$ клеток
0,5	0,5
1,5	1,5
1,0	1,0
3,0	3,0
2,0	2,0

По стандарту мутности готовили начальное разведение контрольного штамма, который есть в лаборатории и дальше десятикратными разведениями довели соответствующий инокулянт по схеме таблицы (таблица 3).

Таблица 3– Приготовление соответствующего разведения

№ пробирки	Количество физиологического раствора	Объем вносимой суспензии	Количество микробных клеток в 1 мл взвеси	Количество микробных клеток в 0,1 мл взвеси
1	4,5 мл	0,5 мл из начальной взвеси 10^8 КОЕ/мл	10^7	1 000 000
2	4,5 мл	0,5 мл из пробирки 1	10^6	100 000
3	4,5 мл	0,5 мл из пробирки 2	10^5	10 000
4	4,5 мл	0,5 мл из пробирки 3	10^4	1000
5	4,5 мл	0,5 мл из пробирки 4	10^3	100
6	4,5 мл	0,5 мл из пробирки 5	10^2	10

Исходную взвесь микроорганизмов производили по стандарту МакФарланд 0,5.

Если использовали стандарт ОСО-42-28-85П, то исходную взвесь приготавливали с концентрацией микроорганизмов 10^9 КОЕ/мл и в схему разведений добавляли разведение до концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Дальше микробную взвесь титровали по данной схеме. Также в лаборатории использовали другие объемы для титрования: 0,9 мл физиологического раствора + 0,1мл вносимой суспензии. Для титрования этих растворов использовали специальные дозаторы. От точности титрования зависела точность приготовления инокулянта. В связи с этим меняли наконечник дозатора для нового разведения [43].

Для этого варили, а потом охлаждали до $42,5^{\circ}\text{C}$, питательные агаровые среды с бактериальными клетками ($5 \cdot 10^7$ клеток/мл) вносили в стерильные чашки Петри в $V=7,5$ мл и оставляли до застывания. Исследуемые образцы наносили на поверхность агаровых сред. Чашки с посевами убирали в термостат на 24 ч при t $35-37^{\circ}\text{C}$.

По размерам зон задержки роста бактерий, а именно по наличию точечных колоний, или их полному отсутствию в области нанесенных проб определяли антибактериальную активность.

Выделенную культуру микроорганизмов бактериологической петлей вносили в пробирки со стерильным 0,85% раствором натрия хлорида и доводили концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по оптическому отраслевому стандарту мутности.

Стандартную микробную взвесь приготавливали разведением в десять раз: 9,0 мл 0,85 % раствора натрия хлорида смешивали с 1,0 мл микробной взвеси до разведения 10^{-1} . В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производили новой стерильной пипеткой объемом 1мл.

В разлитые чашки Петри со средами вносили подготовленную взвесь из микроорганизмов: *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas*

Aeruginosa, *Salmonella Enteritidis* в количестве 1-2 мл, равномерно распределяли по поверхности среды. Остатки суспензии из чашки извлекали путем отсасывания при помощи стерильных пипеток. Далее при комнатной t° подсушивали чашки. Выдерживали чашки 15 минут.

На поверхности питательных сред делали лунки и вносили по капле неразведенного мёда пастеровской пипеткой или прожженной петлей, диаметром 5 мм. На каждую чашку диаметром 90 мм наносилось до 5 капель мёда, так чтоб капли не сливались и не растекались. Дали постоять в течении 20 минут и убирались чашки в термостат при температуре 37 °C на 24 часа.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным компонентам мёда проводили с помощью диско - диффузионного метода.

Готовили ряд из пробирок с необходимым разведением, как для темного сорта, так и для светлого сорта мёда. Для этого брали 0,85% физиологический раствор. В каждую пробирку добавляли по 10 мл физиологического раствора, в первую пробирку добавляли заранее взвешенный мёд в количестве 1 грамм. Из первой пробирки с помощью пипетки переносили разведение во вторую пробирку в количестве 1 мл, из второй пробирки в третью в количестве 1 мл, из третьей в четвертую пробирку в количестве 1 мл, из четвертой пробирки в пятую в количестве 1 мл и так получились 5 последующих разведений. Итак в первой пробирке получили разведение 10^{-1} или 1 : 10, во 2 пробирки 10^{-2} или 1 : 100, в третьей 10^{-3} или 1 : 1000, 10^{-4} или 1 : 10000, 10^{-5} или 1 : 100000 (рис. 4).

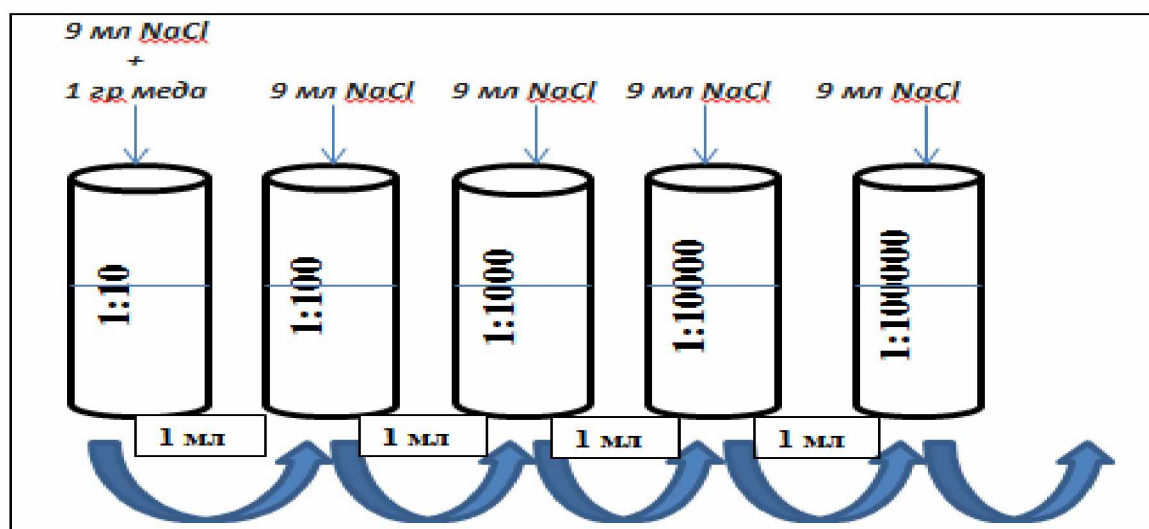


Рисунок 4. Разведение мёда

Готовили бумажные диски из фильтровальной бумаги, пропитывали их по 5 - 10 мкл каждой взвесью из разведения в пробирках, у меня их пять. Оставляли пропитаться на 20-30 минут (рис. 5).



Рисунок 5. Подготовка бумажных дисков

Засевали газоном на чашки Петри взвесь бактериальных культур: *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*. На поверхность питательных сред наносили диски пропитанные раствором мёда. Наносили диски с помощью стерильного пинцета. На каждую чашку диаметром 90 мм наносили по 5 дисков пропитанных определенным разведением из мёда, прижимали их к поверхности среды

пинцетом. Дали постоять в течении 20 минут и убрали чашки в термостат при температуре 37 °C на 24 часа.

После окончания инкубации чашки помещали вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45°: учет в отраженном свете. С помощью специальной линейки измеряли диаметры зон задержки роста с точностью до 1 мм.

2.3.3 Микробиологический метод исследования

Для тестирования антимикробных свойств мёда в бактериологической лаборатории были отобраны штаммы микроорганизмов, выделенные от пациентов. Культура *Staphylococcus Aureus* была высеяна у больного из брюшной полости при перитоните, *Escherichia Coli* высеяна у пациента, страдающим хроническим пиелонефритом, *Pseudomonas Aeruginosa* высеяна у больного с раневой поверхностью, *Salmonella Enteritidis* высеяна у ребенка при энтерите. Эти больные длительно принимали антибиотики без клинического улучшения. При клинической неэффективности в результате приема антибиотиков, приходилось менять антибиотик, вследствие чего у микроорганизмов сформировалась устойчивость к антибиотикам.

Подготовка проб к анализу на антибактериальную активность производилась по алгоритму, для чего потребовалось провести ряд процедур [12] (рис. 6).



Рисунок 6. Подготовка проб к анализу

Антибактериальную активность в отношении тестируемых культур на плотных средах определяли с помощью метода диффузии в агар и диско – диффузионного метода, используя стандартные диски, пропитанные изучаемым препаратом, измеряя зоны задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска.

Также использовали для определения чувствительности способы разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций мёда с помощью испытываемых культур микробов.

2.3.4 Оборудование, применяемое для исследований

Для тестирования антимикробных свойств меда в бактериологической лаборатории применялось следующее оборудование (рис.7):

1. Аквадистиллятор для производства дистиллированной воды, при приготовлении питательных сред, заливки автоклавов.
- 2.Автоклав ВК 75-01 предназначен для стерилизации питательных сред, посуды.
3. Термостат предназначен для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды.
4. Весы электронные предназначены для взвешивания навесок питательных сред.
5. Средоварка Agarster Eco Mini предназначена для готовки стерилизованных питательных сред.
6. РН- метрпредназначендля измерения водородного показателя.
7. Дезар- 6 предназначен для дезинфекции отделов лаборатории.
8. Суховоздушный шкаф ГП-80 предназначен для стерилизации и подсушивания лабораторной посуды.
9. Холодильник медицинский предназначен для хранения питательных сред, реактивов, сывороток.
- 10.Элетроплиту используют для приготовления питательных сред.

11. Микроскоп БИОЛАН предназначен для изучения и выделения микроорганизмов с помощью иммерсии.

12. DENSILAMETER предназначен для ускоренного определения мутности бактериальной взвеси. С помощью прибора измеряют мутность растворов по МакФарланду, в диапазоне от 0 -15.



Рисунок 7. Оборудование для исследований:

а) аквадистиллятор, б) автоклав ВК 75-01, в) микроскоп БИОЛАН, г) термостат, д) DENSILAMETER, е) весы электронные, ж) средоварка Agarster Eco Mini, з) рН-метр, и) дезар-6, к) холодильник медицинский, л) сухо-воздушный шкаф ГП-80, м) электроплита

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты ионообменной хроматографии

После проведения разделения исходного раствора мёда методом ультрафильтрации, полученный раствор, содержащий молекулы с массой от 0 до 10 кДа, подвергался разделению методом ионообменной хроматографии в варианте катионообменной с целью очистки и выделения пептидной фракции мёда.

В ходе исследования было также определено, что для конкретной хроматографической системы существует определённый оптимальный объём наносимой разделяемой пробы, при котором выход целевых продуктов — разделяемых пептидов — окажется наиболее оптимальным. Для изучения этого явления разделение исследуемого раствора пептидов мёда методом катионообменной хроматографии выполнялось несколько раз при идентичных условиях разделения, но при разном объёме наносимой пробы.

Оказалось, что при увеличении объёма наносимой пробы с 200 мкл до 400 мкл не наблюдается увеличение содержания пептидов во фракциях, элюируемых десорбирующим буферным раствором, то есть очищенных от углеводов и других балластных веществ, а даже наоборот — уменьшается. Предполагается, что высокое количество углеводов, попавших на колонку вместе с пробой увеличенного объёма, мешает эффективно связываться заряженным пептидам и заряженным ионогенным функциональным группам носителя — КМ-целлюлозы, что отрицательно сказывается на конечной концентрации полученных пептидов (рис. 8 и 9). Опытным путём было установлено, что при разделении в условиях созданной хроматографической системы (КМ-целлюлоза, размеры колонки 1,6×8 см, объём сорбента — 5 мл) оптимальным объёмом наносимой пробы является 200 мкл.

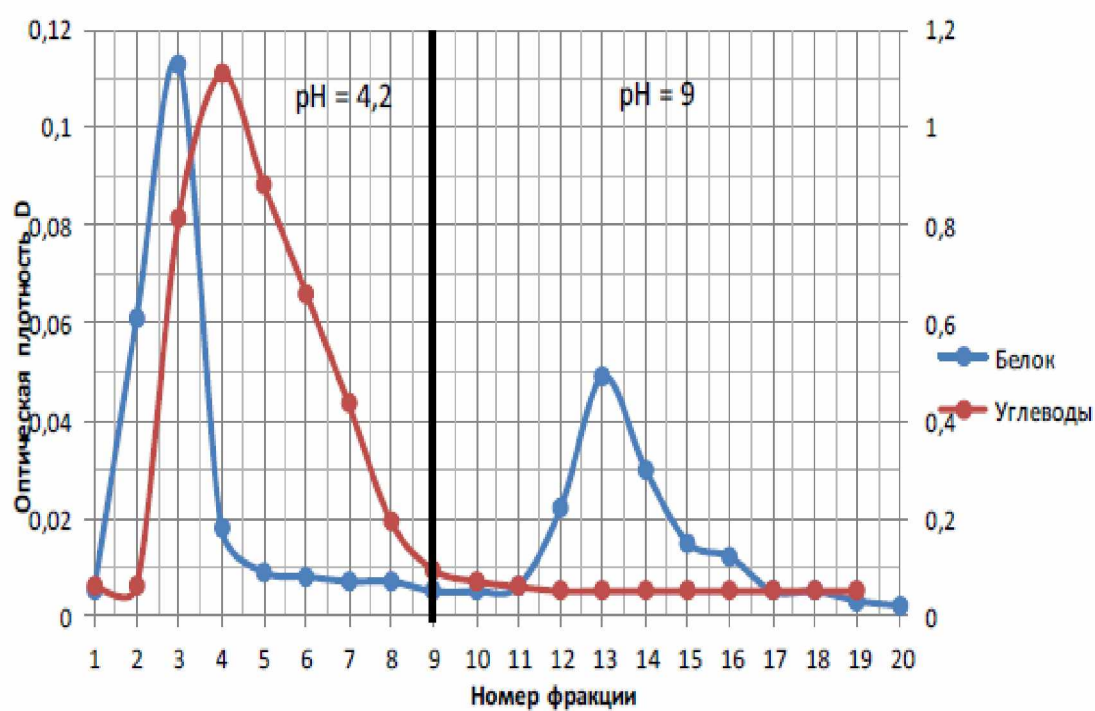


Рисунок 8. Профиль элюции пептидов на КМ-целлюлозе,
V пробы 200 мкл

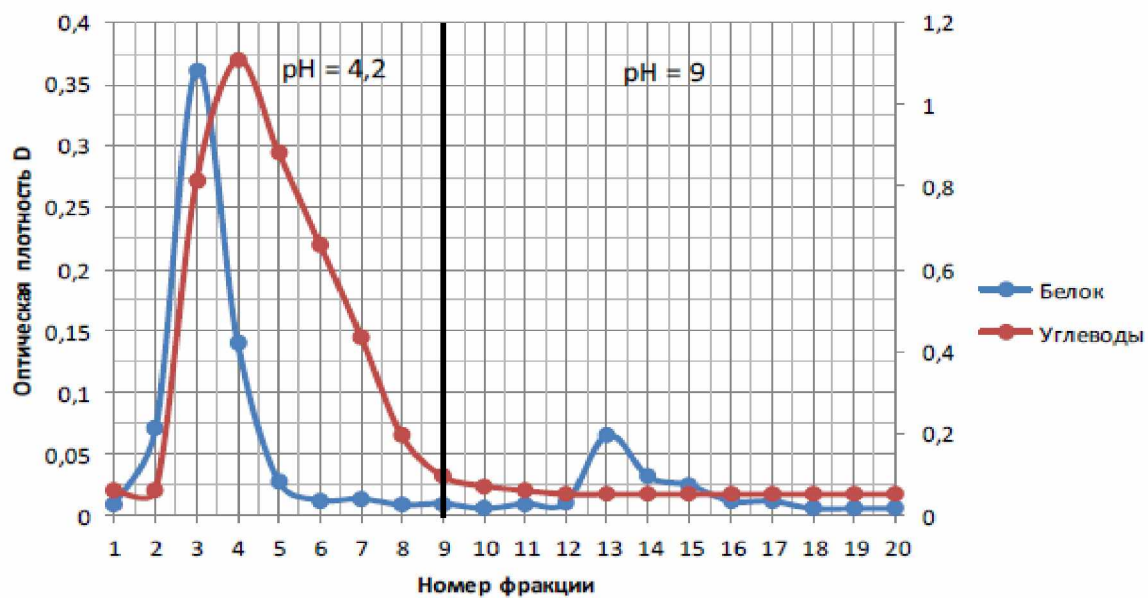


Рисунок 9. Профиль элюции пептидов на КМ-целлюлозе,
V пробы 400 мкл

Подробно разделение исследуемого раствора мёда с молекулами массой до 10 кДа осуществлялось следующим образом: микродозатором на верхний слой носителя под столб первичного буферного раствора (0,2 М Na ацетатный, pH = 4,2) наносили пробу разделяемого раствора объёмом 200 мкл и проводили элюцию со скоростью 1,5 мл/мин. После сбора 8 фракций по 1,5 мл буферный раствор меняли на десорбирующий (0,2 М трис-HCl, pH = 9) и собирали 12 фракций. Контроль концентрации углеводов определяли реакцией Селиванова, концентрации пептидов — методом Лоури.

Для получения достаточного количества исследуемого материала — очищенного от углеводов раствора пептидов мёда — разделение раствора мёда с молекулами массой от 0 до 10 кДа методом катионообменной хроматографии проводилось несколько раз. Пробы с максимальным содержанием пептидов сливались в одну и использовались для дальнейших манипуляций.

Таким образом, с помощью метода ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе, выделили положительно заряженные группы пептидов до 10 кДа, очищенные от углеводного компонента, которые не сорбировались на колонке и вышли в свободном объеме.

3.2 Результаты гель-фильтрации раствора мёда

Для очистки полученных фракций пептидов мёда после ионообменной хроматографии от низкомолекулярных примесей и загрязнений на колонку, заполненную сефадексом G-25, наносят очищаемый раствор в объёме 0,5 мл и элюируют дистиллированной водой, собирая фракции объёмом 1,5 мл. Контроль выхода пептидов с колонки осуществлялся с помощью метода Лоури (рис. 10).

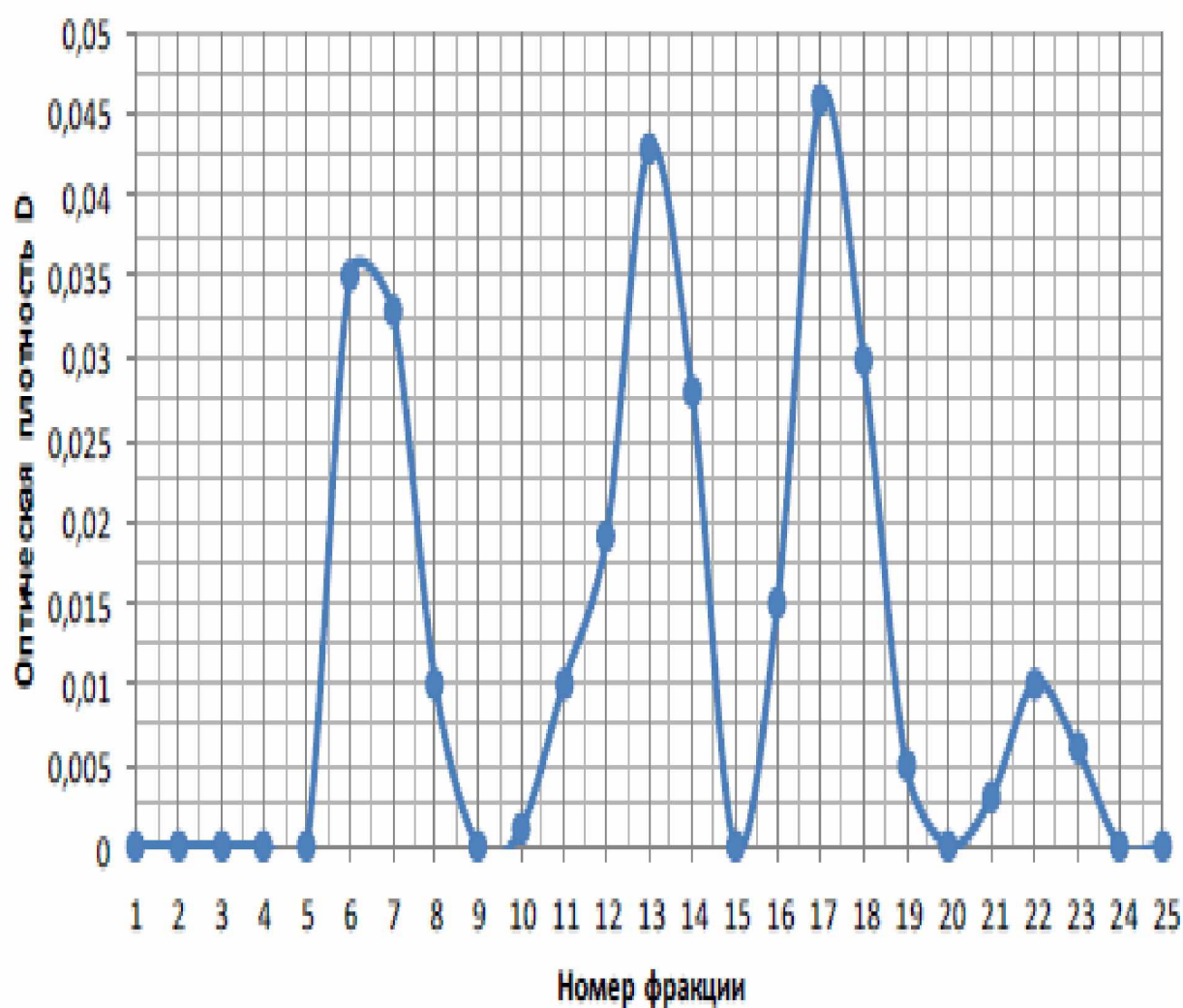


Рисунок 10. Профиль элюции пептидов

Первый пик пептидов с оптической плотностью 0,035, вышедшими в свободном объеме, второй и третий пики пептиды с оптической плотностью 0,042 и 0,045, а четвертый пик представлен пептидами с оптической плотностью 0,01.

3.3 Результаты изучения антибактериальной активности

3.3.1 Результаты изучения антибактериальной активности мёда

Результаты сравнительного анализа темного и светлого сортов мёда [35, 43] представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Сравнительный анализ сортов мёда

Образцы мёда	Гречишный	Цветочный
Место происхождения	Кузнецкий район, деревня Пенделка	Камешкирский район, село Болтино
Физические свойства	Более густая структура, не кристаллизуются длительное время	Более жидкое состояние, полная кристаллизация
Отличия	Большое количество микроэлементов: железо, медь, магний, цинк, калий, кальций, фосфор, марганец, алюминий, большое количество витаминов групп В, К, Р, богат антиоксидантами	Витамин группы В, К, витамин С, фолиевая кислота, каротин, углеводы, белки аминокислоты, микроэлементы: марганец, йод, фосфор, молибден
Лечебные свойства	Один из самых целебных. Заболевание крови, дефицит железа, ослабленном иммунитете, при атеросклерозе, помогает бороться с раком	При простудах, кашле, обладают жаропонижающим эффектом, при проблемах с печенью и желчевыводящими путями

В ходе исследований определяли антибактериальную активность разных сортов меда и пептидных фракций *in vitro*.

Для этого использовали питательные среды Мюллера - Хилтон, предназначенные для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным компонентам мёда.

Антимикробную активность неразведенного мёда в отношении тестируемых культур на плотных средах определяли с помощью метода диффузии в агар. Антибактериальную активность разведенного меда определяли с помощью диско - диффузионного метода.

На результаты исследований диско - диффузионным методом и методом диффузии в агар влияли многие факторы: густота инокулюма, толщина агаровой пластинки, концентрация мёда в пропитанном диске из фильтровальной бумаги, pH среды, выработка бета-лактамаз испытуемыми микробами.

Полученный результат первичных посевов выращенных культур представлен на рисунке 11.

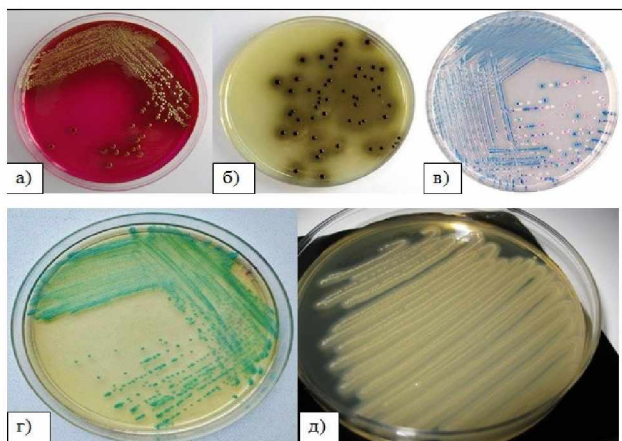


Рисунок 11. Рост культур на чашках Петри:

- а) *E.coli* на среде Эндо;
- б) *Salmonella enteritidis* на среде висмут-сульфит агар;
- в) среда ХРОМАГАР HiMedia, для обнаружения *Escherichia coli*;
- г) *Pseudomonas aeruginosa* на обычном агаре;
- д) *Staphylococcus aureus* на среде желточно- солевой агаре (ЖСА)

На следующий день отвили выращенные колонии культур и сделали несколько пассажей на плотную питательную среду в пробирке Клиглера или Олькеницкого, для выделения чистых культур *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* (рис.12).



Рисунок 12. Выделенные тест-штаммы Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa, Salmonella Enteritidis

На третий день исследования делали микроскопию с выросших культур, мазки окрашивали по Грамму и смотрели под микроскопом с помощью иммерсии. При микроскопии обнаружили грамм «-» палочки и грамм «+» кокки (рис13). Ставили биохимические тесты для последующей идентификации.

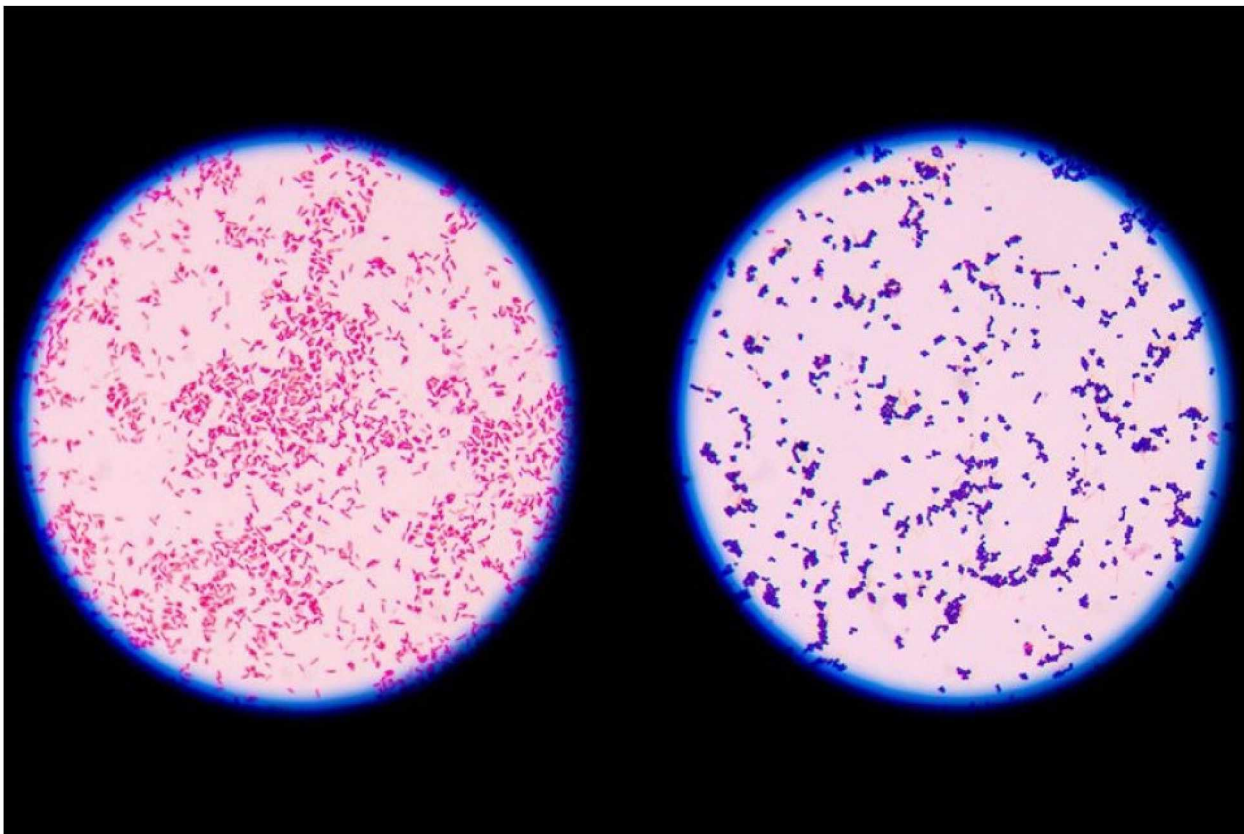


Рисунок 13. Окрашка по Грамму: грамм «-» палочки (розовые) и грамм «+» кокки (фиолетовые)

Для подтверждения культуры *Staphylococcus Aureus* проводили тест на плазмокоагуляцию.

Для подтверждения культуры *Escherichia Coli* ставили биохимические ряды с сахарами в пробирках.

Для подтверждения культуры *Salmonella Enteritidis* проводили агглютинацию на стекле с помощью сывороток и смесей, если агглютинация была положительной, проводили тест с сальмонеллезным фагом.

Для подтверждения культуры *Pseudomonas Aeruginosa* ставили биохимические ряды, а также видели зеленый пигмент и ощущали специфический запах мыла.

После выделения культур, проводили проверку подтверждения их степени чистоты. Инокулят готовили с использованием стандарта мутности или спектрофотометра.

На четвертый день исследования проводили аппликацию дисков, содержащих растворы светлого и темного сортов меда и нанесение неразведенного меда в лунки на чашках с культурами *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia Coli*, выращенных на среде Мюллера – Хилтон.

На пятый день исследования проводили анализ антибактериальной активности мёда по зоне задержки роста (рис.14,15).



Рисунок 14. Результаты исследований антибактериальной активности темного сорта мёда методом диффузии в агар



Рисунок 15. Результаты исследований антибактериальной активности светлого сорта мёда методом диффузии в агар

Результаты измерения зон задержки роста представлены в таблице (таблица 5).

Таблица 5 – Зона задержки роста тестируемых культур, в мм при анализе антибактериальной активности неразведенного темного и светлого сорта меда методом диффузии в агар

№ тестируемой культуры	Тестируемые культуры	Зона задержки роста тестируемых культур, в мм	
		Темный сорт мёда	Светлый сорт мёда
1	Staphylococcus Aureus	12 мм	Нет зон задержки роста
2	Escherichia Coli	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста
3	Pseudomonas Aeruginosa	12 мм	Нет зон задержки роста
4	Salmonella Enteritidis	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста

В чашках Петри после инкубации, с образцами темного мёда, из-за появления видимых колоний бактерий Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa, Salmonella Enteritidis среда стала непрозрачной, за исключением областей, где были нанесены исследуемые образцы мёда. В этих областях отсутствует рост микроорганизмов, что свидетельствует о наличии антибактериального эффекта темного сорта меда. В чашках Петри, с образцами светлого мёда, наблюдался интенсивный рост

данных микроорганизмов, что говорит об отсутствии антибактериальной активности.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии антибактериальной активности темного сорта меда по отношению к культурам *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. Антибактериальная активность у светлого сорта меда по отношению к культурам *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* не выявлена.

Исследования с разведенным мёдом на антибактериальную активность проводили при помощи диско - диффузионного метода по схеме, описанной на рисунке 5, главы материалы и методы исследований.

Готовили разведение мёда (рис.16).

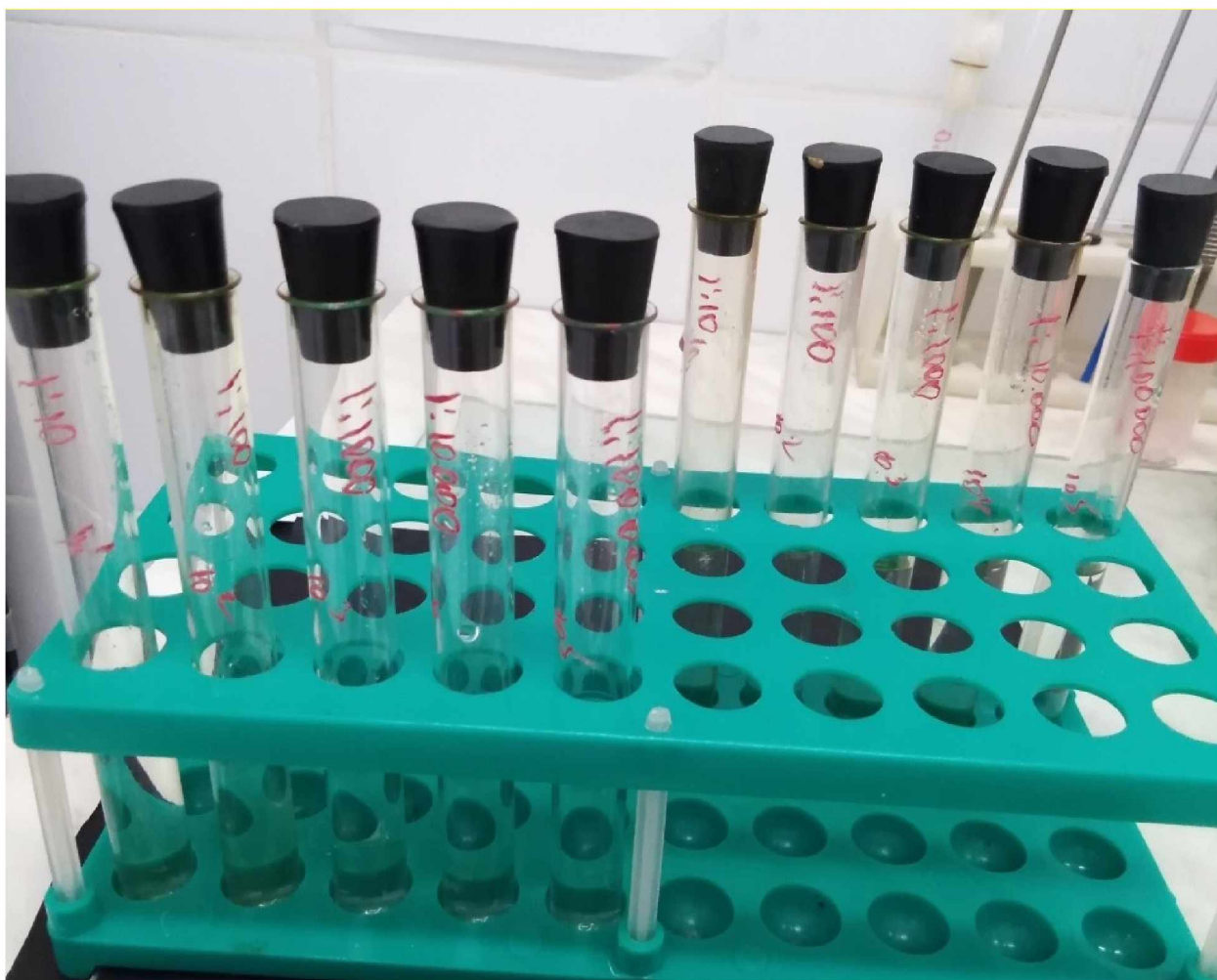


Рисунок 16. Разведение мёда

Наличие антибактериальной активности определяли по диаметру зон задержки роста (рис.17,18).



Рисунок 17. Результаты исследований антибактериальной активности светлого сорта мёда диско – диффузионным методом



Рисунок 18. Результаты исследований антибактериальной активности темного сорта мёда диско – диффузионным методом

Результаты измерения зон задержки роста представлены в таблице (таблица 6).

Таблица 6 – Зона задержки роста тестируемых культур, в мм при анализе антибактериальной активности разведенного темного и светлого сорта меда диско – диффузионным методом

№	Тестируемые культуры	Зона задержки роста тестируемых культур, в мм	
		Темный сорт мёда	Светлый сорт мёда
1	Staphylococcus aureus	12 мм±1.8	Нет зон задержки роста
2	Escherichia coli	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста
3	Pseudomonas aeruginosa	12 мм±2.0	Нет зон задержки роста
4	Salmonella enteritidis	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста

В чашках Петри после инкубации, с образцами темного мёда, из-за появления видимых колоний бактерий Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa, среда стала непрозрачной, за исключением областей, где были нанесены исследуемые образцы мёда. В этих областях отсутствует рост микроорганизмов, что свидетельствует о наличии антибактериального эффекта темного сорта меда. В чашках Петри, с образцами светлого мёда, наблюдался интенсивный рост данных микроорганизмов, что говорит об отсутствии антибактериальной активности.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии антибактериальной активности темного сорта меда по отношению к

культурам *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. Антибактериальная активность у светлого сорта меда по отношению к культурам *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* не выявлена.

Минимальную подавляющую концентрацию мёда определяли, используя метод серийных разведений в жидкой питательной среде.

Исследование проводили в объеме 1 мл каждого разведения мёда с конечной концентрацией исследуемого микроба приблизительно $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Питательный бульон Мюллера – Хилтона для определения чувствительности наливали по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяли необходимым диапазоном разведений мёда и увеличивали на одну для постановки « - » контроля.

Раствор мёда готовили из основного раствора, использовали жидкую питательную среду. Концентрацию рабочего раствора рассчитывали из нужной максимальной концентрации в ряду серийных разведений, учитывали фактор разбавления мёда при последующей инокуляции. Далее раствор в 0,5 мл при помощи дозатора со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, с 0,5 мл бульона. Перемешивали и новым стерильным наконечником переносили 0,5 мл раствора мёда в бульоне во вторую пробирку, с первоначальным V 0,5 мл бульона. Эту процедуру повторяли до окончания ряда разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона выливают.

Получали ряд из пробирок с растворами мёда, концентрации которых отличались в соседних пробирках в 2 раза. Вместе с ними готовили дополнительные ряды серийных разведений мёда для тестирования контрольных штаммов.

Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, и сконцентрация микроорганизма в ней 10^6 КОЕ/мл.

По 0,5 мл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл разведения мёда, и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без мёда «-» контроль. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке около 5×10^5 КОЕ/мл. Инокулюм вносили в пробирки с разведениями мёда не более 15 - 30 минут с момента приготовления.

Пробирки закрывали стерильными пробками и инкубировали при температуре 37°C, 24 часа.

Учитывали результаты в проходящем свете, чтобы рассмотреть наличие роста микроорганизма в пробирках. Сравнивали рост культур в пробирках с разведенным мёдом и с пробиркой « - » контроль. Минимальную подавляющую концентрацию определяли по наименьшей концентрации мёда, которая подавляла видимый рост микроорганизма (рис.19,20).

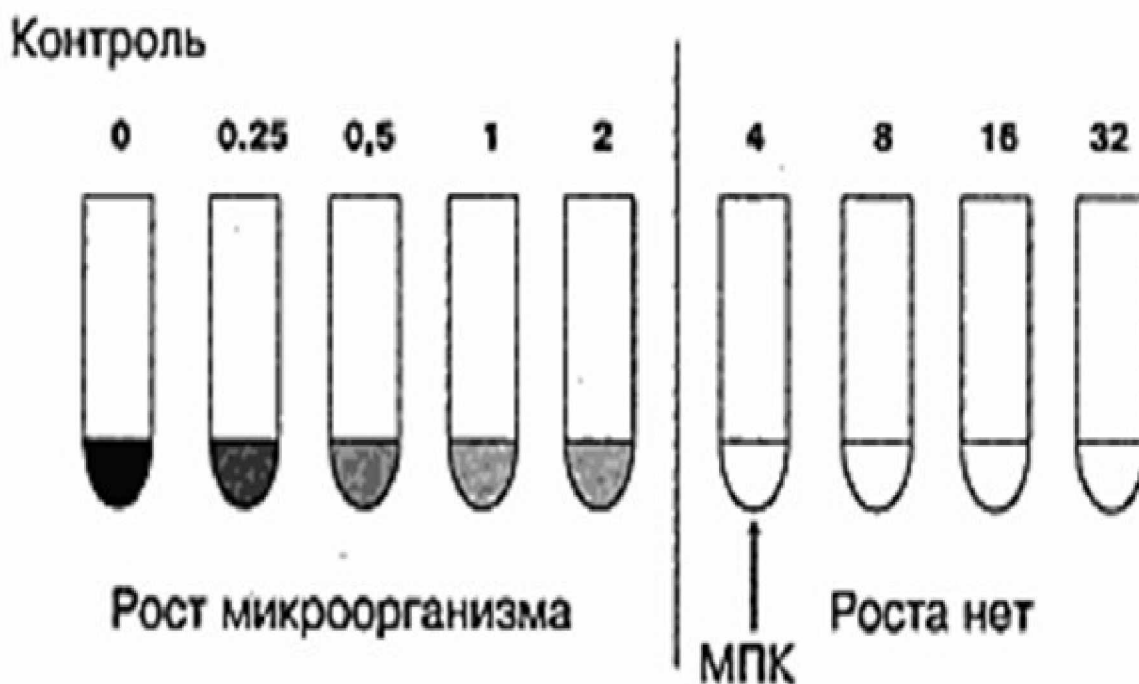
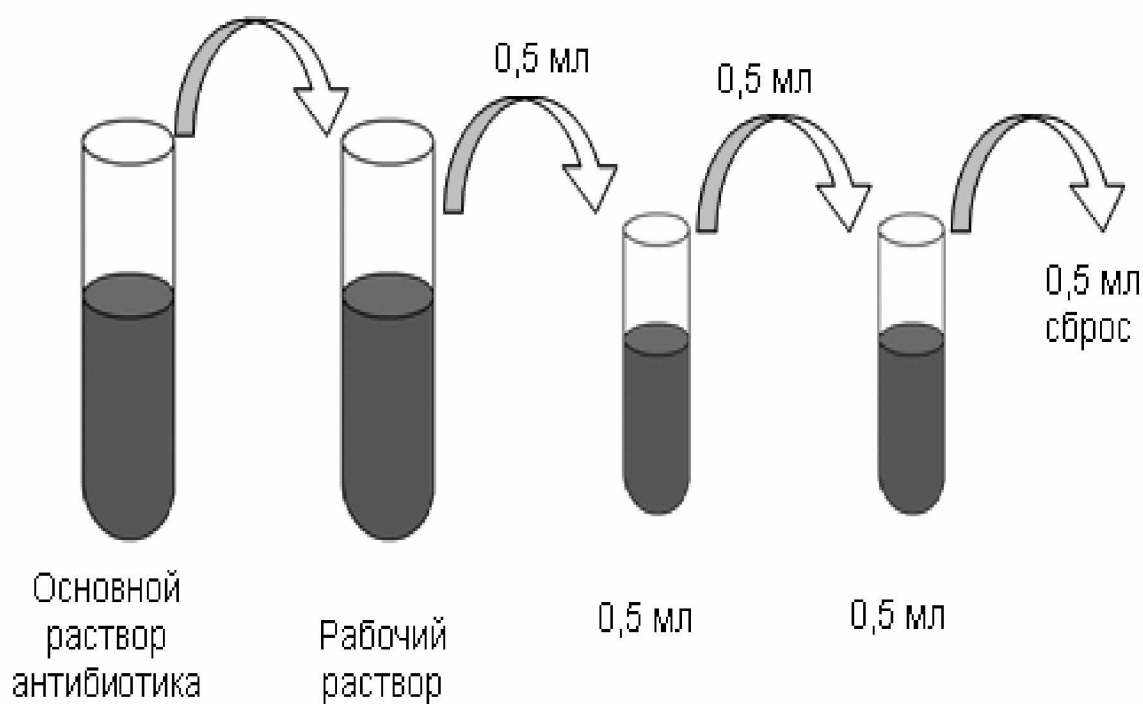


Рисунок 19. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) – наименьшая концентрация мёда (в мг/л).

I – Приготовление серийных разведений



II – Добавление инокуляма

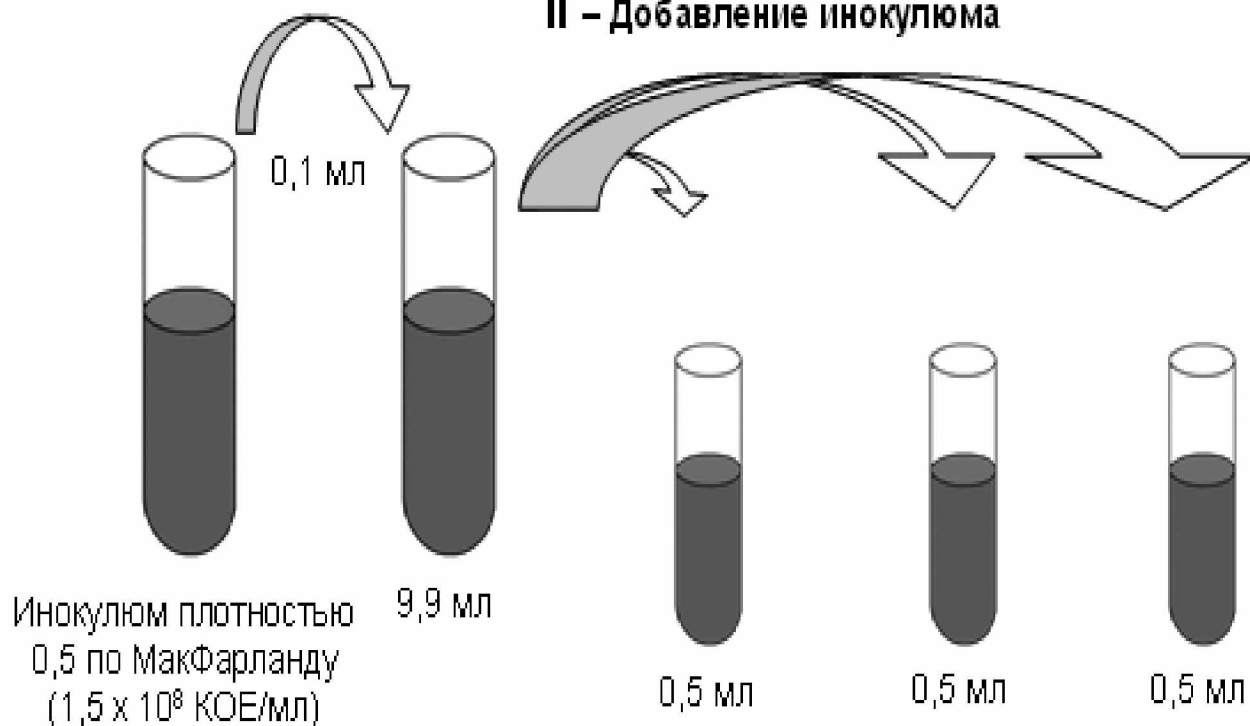


Рисунок 20. Алгоритм определения чувствительности одной исследуемой культуры к одному антибактериальному препарату методом разведений в жидкой питательной среде

По результатам исследований этого метода определили минимальную подавляющую концентрацию темного и светлого мёда (таблица 7).

Таблица 7 — Активность мёда с пасеки Пензенской области в отношении исследуемых штаммов

Образец	Тестовая культура	<i>Результаты исследований МПК растворов полученных методом серийных разведений</i>						
		3,75%	5%	7,5%	10%	15%	20%	30%
Темный сорт мёда	Staphylococcus Aureus	-	-	-	+	+	+	+
	Escherichia Coli	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudomonas Aeruginosa	-	-	-	+	+	+	+
	Salmonella Enteritidis	-	-	-	-	-	-	-
Светлый сорт мёда	Staphylococcus Aureus	-	-	-	-	-	-	-
	Escherichia Coli	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudomonas Aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-
	Salmonella Enteritidis	-	-	-	-	-	-	-

Образцы темного сорта мёда подавляли рост Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa при минимальной подавляющей концентрации от 10% до 30%. В отношении Escherichia Coli, Salmonella Enteritidis антибактериальная активность темного сорта мёда не выявлена. Также не обнаружена антибактериальная активность светлого сорта мёда.

3.3.2 Результаты исследований антибактериальной активности пептидных фракций

Для исследования антибактериальной активности пептидных фракций светлого и темного сорта мёда *in vitro* был выбран диско - диффузионный метод.

Исследование антибактериальной активности пептидных фракций мёда *in vitro* осуществляли в несколько этапов, использовали среды Мюллера – Хилтон, на которые производили посевы с тестируемыми культурами *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*.

Исследования на антибактериальную активность проводили при помощи диско - диффузионного метода по схеме, описанной на рисунке 5, главы материалы и методы исследований.

Наличие антибактериальной активности пептидных фракций мёда определяли по диаметру зон задержки роста (рис.21,22).

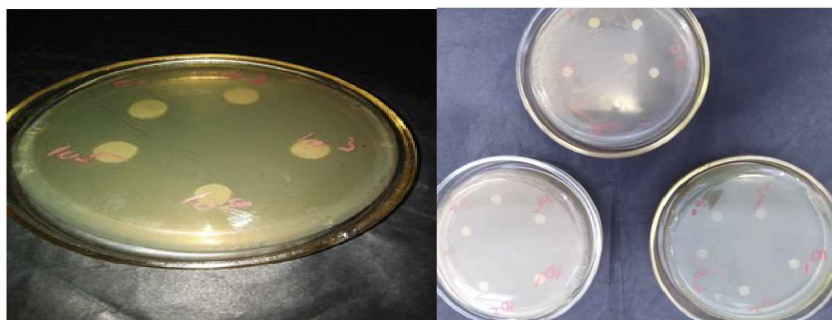


Рисунок 21. Результаты исследований антибактериальной активности пептидных фракций светлого сорта мёда диско – диффузионным методом



Рисунок 22. Результаты исследований антибактериальной активности пептидных фракций темного сорта мёда диско – диффузионным методом

Результаты измерения зон задержки роста представлены в таблице (таблица 8).

Таблица 8 — Зона задержки роста тестируемых культур, в мм при анализе антибактериальной активности пептидных фракций темного и светлого сорта меда диско – диффузионным методом

№ тестируемой культуры	Тестируемые культуры	Зона задержки роста тестируемых культур, в мм	
		Пептидные фракции темного сорта мёда	Пептидные фракции светлого сорта мёда
1	Staphylococcus Aureus	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста
2	Escherichia Coli	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста
3	Pseudomonas Aeruginosa	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста
4	Salmonella Enteritidis	Нет зон задержки роста	Нет зон задержки роста

Пептидные фракции, полученные из темного и светлого сорта мёда последовательной ультрафильтрацией, ионообменной хроматографии и гель фильтрацией не обладали антибактериальной активностью, о чем говорит отсутствие зон задержки роста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мёд является уникальным многокомпонентным продуктом с целебными свойствами. Мёд – содержит большое количество витаминов, микроэлементов, ферментов, до 80% сахаров, азотосодержащих соединений, органических кислот, и пептидов.

Антибактериальный эффект может быть обусловлен содержанием в нем различных веществ: перекиси водорода, метилглиоксала, антимикробных пептидов.

В ходе исследования были протестированы два сорта мёда и пептидные фракции, полученные из них методами: в методе диффузии в агар, при диско – диффузионном методе, так и с помощью способа разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК).

Доказано, что различные сорта мёда и концентрации мёда по-разному влияли на культуры *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*.

Отмечено, что антибактериальной активностью обладал темный сорт мёда по отношению к культурам *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. Антибактериальная активность у светлого сорта меда по отношению к культурам *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* не выявлена.

Не смотря на то, что мёд и другие продукты пчеловодства могут рассматриваться в качестве сырья для выделения антибактериальных препаратов пептидной природы, нам не удалось получить подтверждения наличия антибактериального эффекта пептидных фракций, выделенных последовательной ультрафильтрацией, ионообменной хроматографии и гель фильтрацией.

Установлено, что исследуемые пептиды мёда не обладают антимикробной активностью в отношении исследуемых микроорганизмов:

Escherichia Coli, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* и *Staphylococcus Aureus*.

В связи с этим можно сделать следующие **выводы**:

1. Отмечено, что мёд обладает уникальным компонентным составом: минеральными веществами, макроэлементами, микроэлементами, пептидами и обладает антибактериальной активностью.

2. Пептидные фракции были получены из темного и светлого сорта мёда с использованием методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель фильтрации и последующим концентрированием путем лиофилизации. Концентрация пептидов в итоговом растворе составила 395 ± 15 мкг/мл.

3. Установлено наличие антибактериальной активности темного сорта мёда в отношении культур *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* методами диффузии в агар, диско – диффузионным методом. Минимальная подавляющая концентрация составила 10%. Антибактериальная активность светлого сорта мёда и пептидных фракций, выделенных последовательно ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель фильтрации не выявлена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазов Б. В. Практическое руководство по хроматографии / Высшая школа, 1968. 279 с.
2. Белик Э.В. Большой современный справочник пчеловода / Донецк, 2004. 512 с.
3. Бози Г. Количество определенных аминокислот в некоторых сортах пыльцы, собранных медоносной пчелой // Материалы XXV Международного конгресса по пчеловодству в Гренобле. Бухарест: Апимондия, 1975. С. 466-471.
4. Борисова, М. Лечение медом / М., Издательский дом "Литера", 2005. 60 с.
5. Брок Т. Мембранная фильтрация: пер. с англ. / М., Мир, 1987. 464 с.
6. Доусон Р. Справочник биохимика / М., Мир, 1991. 544 с.
7. Иойриш Н. П. Продукты пчеловодства и их использование / М., Россельхозиздат, 1976. 100 с.
8. Каблуков И. А. О меде, воске, пчелином клее и их подмесах / Москва: Сельхозгиз, 1941. 176 с.
9. Кокряков В. Н., Алешина Г. М., Шамова О. В., Овчинникова Т. В. Антибиотические пептиды как эффекторные и регуляторные факторы врожденного иммунитета // Тезисы докладов объединенного иммунологического форума. Екатеринбург, 2004. №1. С. 73.
10. Крылов В. А. Введение в хроматографические методы анализа / Н.: Нижний Новгород, 2010. 91 с.
11. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / М., Гриф и К°. 2012. 944 с.
12. Михайлова В.С., Поляк М.С., Суханова С.М. О роли внутри лабораторного контроля качества в стандартизации питательных сред для микробиологических исследований диагностических лабораториях // Проблемы стандартизации в здравоохранении. 2009. С.8-15.

13. Михайлова В.С. Культивирование бактерий: методики клинических лабораторных исследований / Том III. Клиническая микробиология. М., Лабора, 2009. 250 с.
14. Монахова В. Г. Некоторые вопросы получения, хранения и использования пыльцы // Биологически активные продукты пчеловодства и их использование. Горький, 1990. С. 90 – 96.
15. Новиков Д. А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии: методическое пособие к лабораторным занятиям / БГУ. Минск, 2014. 70 с.
16. Овчинникова Т. В. Структурно-функциональное исследование природных пептидных антибиотиков // автореф. дис. д-ра хим. наук. М., 2011. 77 с.
17. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / М., Наука. 1985. 536 с.
18. Полищук В. П. Пчеловодство / Выщашк. Головное изд-во. 1990. 325 с.
19. Поляк М.С. Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии // С-Пб. 2008 С.351.
20. Сельцовский А. П. Лечение медом, другими продуктами пчеловодства и лекарственными травами // М., Анахарсис. 2007. 238 с.
21. Скоупс Р. Методы очистки белков // М., Мир. 1985. 358 с.
22. Фритц Дж. Ионная хроматография: Пер с англ. / М., Мир. 1984. 224с.
23. Хефтман Э. Хроматография: практическое приложение метода / М., Мир. 1986. 760 с.
24. Хисматуллина Н.З. Апитерапия / Пермь: Мобиле. 2005. 296 с.
25. Харчук Ю. Мед и продукты пчеловодства / Издательство: Феникс, 2007 г. 85 с.
26. Черевко Ю. А, Носовицкий Ю. А. Значение минеральных элементов меда // Пчеловодство. 2000. № 3. С. 20-25.
27. Шульгина М. В. Разработка принципов изучения антибактериального действия веществ на доклиническом этапе создания лекарственных средств //

- автореферат дисс. докт. биол. наук. Москва.: ММАим. И. П. Сеченова, 1999. 47 с.
28. Allen H. K. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals // *Trends Microbiol.* 2012. P. 114–119.
29. Alvarez-Suarez J. M., S.Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, M. Battino. Contribution of honey in nutrition and human health // *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism.* 2010. №3. P. 15–23.
30. Ando K. *Biochemistry* / 1988.— 1721 p.
31. Bogdanov S., T. Jurendic, R. Sieber. Honey for nutrition and health // *Am J CollNutr.* 2008. №27. P. 677–689.
32. Casteels P., Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees // *The EMBO Journal.* 1989. Vol. 8. №8. P. 2387-2391.
33. Casteels, P. C., Ampe, J. van Damme, C. Elicone, M. Fleming, F. Jacobs, P. Isolation and characterizaton of abaecin, a major antibactirical response peptide in the honeybee (*ApisMellifera*) // *Eur. J. Biochem.* 1990. №187. P. 381-386.
34. Castle, M. A., Nazarian, S.S. Yi, P. Tempst Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets // *J Biol Chem.* 1999. №274. P. 32555-32564.
35. Cooper R.A., Molan P.C. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. // *J. Wound. Care.* 1999. № 8. P 161-164.
36. Guaní-Guerra E., Terán M. L. Antimicrobial peptides: immunomodulatory properties, functions and therapeutic applications in humans // *Antimicrobial Peptides* / M. D. Seong. Y. I. Hak. NY: Nova Science Publishers, 2013. 168 p.
37. Jenssen H. W., Hamill P., Hancock R. E. Peptide antimicrobial agents // *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. №19. P. 491–511.
38. Kris De Smet., Roland C. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins // *Biotechnology Letters.* 2005. V. 27, №13. P. 1337–1347.

39. Lai Y., Gallo R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defence // *Trends in Immunology*. 2009. vol. 30, Issue 3. P. 131-141.
40. Lee S., Mihara H., Aoyagi H. Kato T. *Biochim. Biophys. Acta* . 1986. 862 p.
41. Lees P. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans / ShojaeeAliabadi F // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2002. №19. P. 269-284.
42. Louis A. C. *Antimicrobial Resistance and Food Safety Methods and Techniques* / A. C. Louis. 2015. 323 p.
43. Molan P.C. The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing. // *Wound Practice and Research* 2011; 19: P 204–220.
44. NCCLS National consensus standard. *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard M22-A3*, v., 24, 3d Ed. (Replaces M22-A2), 2004
45. Park C.B., Kim H. S., Kim S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. №244. P. 253–257.
46. Pérez R.A. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry // *J Agric Food Chem.* 2002. №50. P. 2633–2637.
47. Root A. I., Root H. H., Root E. R, Deyell M. J., Root J. A. https://archive.org/details/enciklopediya_pchelovodstva Root.1993.
48. Taormina P. J. Inhibitory activity of honey against food-borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power // *Int J Food Microbiol.* 2001. №69. P. 217–225.
49. Wei-Fen Li. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action // *Peptides*. 2006. Vol. 27, Issue 9. P. 2350-2359.

50. Weston R. J., Brocklebank L. K. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys // J Food Chem. 2000. №70. P. 427–435.
51. Zeina B., Zohra B.I., Assad al S. The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study // J Trop Doct. 1997. №27 (1). P. 36–38.
52. Zhang L. A., Rozek A., Hancock R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes // J. Biol. Chem. 2001. №276. P. 35714–35722.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

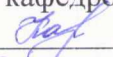
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.04.01 Биология
Магистерская программа
Биохимия и молекулярная биология

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
« 05 » ноября 2019 г.

Задание

По ВКР студента Бичуриной Ларисы Александровны

Тема работы: «Исследование антибактериальной активности пептидных
фракций меда in vitro»

Утверждена приказом по Университету от « 18 » октября 2019 г. № 1145а/о

Срок сдачи студентом законченной работы « 28 » мая 2021 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Подбор и изучение литературы, составление библиографии по теме научного исследования (магистерской диссертации)	Ноябрь 2019- февраль 2020	выполнено
2	Составление содержания магистерской диссертации, подготовка обзора: свойства мёда: химический состав, биологические свойства, антибактериальные компоненты мёда	Декабрь 2019- март 2020	выполнено
3	Оформление теоретической части магистерской диссертации (1 главы), исправление замечаний	Апрель 2020- январь 2021	выполнено
4	Выбор материалов, методов и базы исследования антибактериальной активности пептидных фракций меда in vitro методами: диффузии в агар, диско – диффузионным и серийных разведений в жидкой питательной среде	Ноябрь 2019- февраль 2020	выполнено
5	Выполнение экспериментальной части магистерской диссертации (глава 2)	Январь 2020- январь 2021	выполнено
6	Обработка полученных результатов, оформление таблиц, графиков, их описание.	Январь 2021- май 2021	выполнено
7	Подготовка материалов исследования для апробации на научно-практических конференциях	Май 2021- июнь 2021	выполнено
8	Оформление текста квалификационной работы. Подготовка доклада и презентации	Май 2021- июнь 2021	выполнено
9	Проверка работы магистерской диссертации на наличие заимствования в системе «Антиплагиат»	До 7 июня 2021	выполнено

Дата выдачи задания « 5 » ноября 2019 г.

Руководитель

Br
Анф

Соловьев В.Б.

Кручинина А.Д.

Задание принял к исполнению

Тмур