

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»

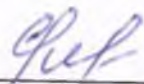
Направление подготовки 44.03.01 Педагогическое образование
Профиль подготовки Биология
Форма обучения заочная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ШКОЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЕКТ «ВЛИЯНИЕ
АНТИБИОТИКОВ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ AZOTOBACTER»»**

Студент



Филимонова Светлана Ивановна

Руководитель



Заплатин Б.П.

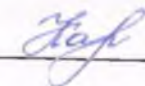
Нормоконтролер



Заплатин Б.П.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 03.06.24 № 18)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

отлично
(протокол заседания ГЭК от 02.06.24 № 6)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ В ШКОЛЕ.....	7
1.1. Определение и значение проектной деятельности	7
1.2. Цели и задачи проектной деятельности в школе.....	13
1.3. Проектная деятельность в школах Пензенской области.....	14
ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
2.1. Влияние антибиотиков на окружающую среду.....	18
2.2. Роль азотфиксирующих бактерий в природе.....	20
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
3.1. Оборудование и реактивы для проведения исследования.....	28
3.2. Описание методики проведения исследования.....	28
3.3. Методы измерения роста азотобактерий. Колонеобразование.....	36
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
4.1. Результаты микробиологического исследования.....	38
4.2. Обсуждение результатов экспериментальной части.....	43
4.3. Обсуждение результатов образовательной части проекта.....	45
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

Работа школьного педагога сегодня уже невозможна без рассмотрения такого направления образовательной деятельности, как реализация различных видов учебных проектов на уроках и во внеурочное время.

Наиболее приемлемым путем повышения мотивации учащихся и улучшения эффективности учебной деятельности в основной школе, является включение учащихся в процесс проведения научных исследований и создания научных проектов. Особое внимание сегодня следует уделить исследовательским учебным проектам как одному из ведущих условий реализации основных идей вводимых образовательных стандартов общего образования.

Метод проектов является одним из интерактивных методов современного обучения и составной частью современного учебного процесса.

Учебный проект представляет собой такое организованное взаимодействие всех субъектов образовательного процесса, при котором обучающиеся приобретают знания в процессе планирования и выполнения постоянно усложняющихся практических заданий, связанных с достижением определенного (запланированного) результата. Данный метод активно работает над развитием критического и творческого мышления учащихся, умением работать с информацией (основной, дополнительной, оперативной). А это в свою очередь в полной мере соответствует основной задаче современной школы – воспитанию социально активной личности, способной к самообразованию и самоорганизации.

Процесс поисковой познавательной деятельности носит название – **учебное исследование**. Данный процесс направлен на получение учащимися новых знаний и их последующее использование для решения творческой задачи с заранее неизвестным для ученика результатом. Исследовательская

деятельность строится на основе правил и в логике научного исследования, что важно для того, чтобы учащийся понимал, что успех в большей части зависит от его умения правильно организовать структуру, хронологию, соблюдая требования каждого этапа. В то же время самостоятельная творческая деятельность, предполагающая достаточно высокую степень свободы в процессе реализации запланированного результата, что может стать привлекательной для ученика, так как позволяет реализовать его внутренние познавательные запросы и мотивы [30].

Примером научных исследований школьников могут служить исследования по микробиологии, которые могут носить междисциплинарный характер.

Проведя детальный анализ школьных учебников биологии, можно сказать, что рассматриваемые в них темы посвященные бактериям довольно фрагментарны. Учебники для 6-7 классов содержат лишь описательный материал, но не раскрывает роли бактерий и других микроорганизмов в жизни человека. В учебниках для 8 класса детально рассмотрены лишь прокариоты, которые вызывают заболевания человека и животного. Информация о болезнетворных бактериях представлена тремя компонентами - сведениями по микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, объединенных идеей важности профилактики инфекционных заболеваний для сохранения здоровья. Курс общей биологии представлен, в основном, материалами о строении клеток про- и эукариот, процессах их жизнедеятельности, роли микроорганизмов в экосистемах, круговоротах химических элементов, происхождении и развитии жизни на Земле, которые служат основой для понимания механизмов биотехнологии и эволюции. [41].

Поэтому, для успешного изучения и формирования целостного представления о прокариотах необходимо определить методические условия или факторы, способствующие успешности учебной деятельности. Можно рекомендовать проведение научно-исследовательских работ, которые позволят расширить знания школьников о бактериях, их роли в природе,

жизни человека и собственной деятельности; возбудителях заболеваний растений, животных и человека, также об антибактериальных препаратах их значении и проблеме антибиотикорезистентности, как о глобальной проблеме XXI века. В литературных источниках имеются сведения о том, что природные непатогенные прокариоты имеют устойчивость к антибиотикам. В том числе, спонтанной антибиотикорезистентностью, вызываемой изменчивостью бактериального генома.

Цель работы: Изучить влияния антибиотиков на рост культуры *Azotobacter*, как пример научно-исследовательского проекта в школе.

Задачи:

1. Изучить тему проведения научно-исследовательских проектов в школе;
2. Изучить влияние антибиотиков на окружающую среду;
3. Изучить роль азотобактерий в природе;
4. Изучить роль научно-исследовательской работы в понимании школьниками темы «бактерии»;
5. Провести эксперимент по выявлению влияния антибиотиков на рост культуры азотобактерий;

Данное исследование дает возможность школьникам поучаствовать в программе «Охотники за микробами» реализуемой в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Центральной лабораторией занимающийся данной программой стал институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Цель программы заключается в проведении крупномасштабных исследований на территории России, в которых участвуют ведущие ученые и студенты, с целью сбора образцов и анализа данных для поиска новых штаммов азотфиксирующих бактерий, продуцентов антибиотиков и

продуцентов протеаз. В ходе проекта школьные исследовательские группы собирают образцы почв, выращивают бактериальные культуры и передают образцы и результаты в ИХБФМ СО РАН [29].

Практическая часть работы была выполнена в лаборатории Пензенского областного клинического центра специализированных видов медицинской помощи. Научно-исследовательский проект «Влияние антибиотиков на рост культуры *Azotobacter*» был предложен для выполнения учащимся 9 «А» класса 76 школы г. Пензы в рамках проектной деятельности школьников, предусмотренной ФГОС.

Выпускная квалификационная работа написана на 44 листах, содержит 8 рисунков и 2 таблицы, список используемой литературы представлен 45 источниками.

ГЛАВА 1. ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ В ШКОЛЕ

1.1. Определение и значение проектной деятельности

Современное образовательное пространство развивается в условиях рыночной экономики и находится под воздействием мировых тенденций: глобализации, информатизации, технологизации. Данные обстоятельства определяют общий характер требований, которые предъявляются к современному школьнику.

В свете перехода на ФГОС нового поколения на школу накладываются задачи по формированию у учащихся способности к творческому мышлению, инициативности, самостоятельности. Это можно сделать при активном внедрении научно-исследовательской деятельности. Развитию творческих способностей школьника, его социальной адаптации и чувству собственной значимости будет способствовать только правильно организованная и систематизированная исследовательская деятельность. Далеко немногие ученики имеют способность, а главное желание и время заниматься научно-исследовательскими проектами. [37].

Основной задачей педагога является привлечение внимания к предмету исследований и повышение мотивации к саморазвитию учащихся за счет исследовательской деятельности. Педагогу важно учитывать то, что не стоит пренебрегать учащимися, которые менее заинтересованы и не проявляют инициативу, в процессе работы можно развить интерес учащихся к предмету.

Термин «проектная деятельность» не имеет однозначной трактовки, хотя данное понятие не является новым. Многие исследователи (А. Шюц, П. Бергер, Т. Лукман, К. Манхейм, Э. Блох, Ч. Миллс и др.) считают, что проектная деятельность аналитико-синтетической, что отражает лишь деятельностный компонент, заключенный в понятиях «проект» и «проектирование» [30].

Сторонниками данного подхода (К.Г. Абульханова-Славская, Б.Г. Ананьев, А.Г. Асмолов, М.С. Каган, А.Н. Леонтьев, С.Л. Рубинштейн, Р.Х. Шакуров, С.Т. Шацкий и др.) цель деятельности характеризуется наличием конкретных образов, субъективна, определяет структуру и содержание деятельности. Образ-цель определяет критерии отбора информации о состоянии объекта и, по мнению Б.Ф. Ломова, направляет процесс переработки информации и принятия решения, корректирует исполнительные действия [1, 8, 9, 11, 22]. В психологической теории деятельности цель по отношению к мотиву выступает как его конкретизированная, наглядная форма [24].

Некоторые авторы (Дж. Дьюи, У. Килпатрик и др.), принимая за основу метод проектов и не раскрывая психологических механизмов, которые и обеспечивают ее успешность в педагогической практике, упускают ее научную составляющую. Структура и само содержание метода проектной деятельности часто не раскрыты и не описаны во взаимосвязи ее частей (компонентов). Потому, обзор литературных источников показывает, что проектную деятельность как метод, целесообразно анализировать позиции системного и деятельностного подходов одновременно. [7, 13, 18, 30].

Если рассматривать проектную деятельность с точки зрения системного подхода, то важно разделять структурные элементы и сделать акцент на взаимосвязи этих элементов. Основной принцип системного подхода заключается во взаимосвязи всех элементов, объект рассматривается со всех сторон, как единое целое, а также в рассмотрении всех предполагаемых связей и корреляций. Элементы системного подхода взаимодействуют гармонично и согласованно. Если рассматривать проектную деятельность с точки зрения системного подхода. Из преимуществ системного подхода стоит отметить гибкость и адаптивность, способность подстраиваться под индивидуальные особенности. М.С. Каган, в своей работе, выделяет в структуре проектной деятельности несколько

компонент (элементов): ценностно-ориентационную, познавательную, преобразовательную и коммуникативную [17].

Первая компонента, связана с ценностями, определяется личной значимостью и важностью деятельности для ученика. Она служит стимулом для его активности, формируя отношение к процессу и результатам. Ценность проектной деятельности выступает как индивидуальный и социальный ориентир, представляя собой идею, которая воспринимается как субъективный образ или представление, является отражением культурно-исторических норм, ассоциируется с типом «достойного» поведения, определяющим конкретный стиль жизни, что неоднократно было исследовано в работах многих ученых (К.А. Абульханова-Славская, Г.Г. Дилигенский, О.Г. Дробницкий и др.) [17].

В трудах В. Франкла выделяются три группы ценностей, которые могут послужить мотивацией для деятельности: ценность творчества, заключающаяся в созидании; ценность переживания, проявляющаяся в нашей чувствительности к окружающему миру; и ценность отношений. Ценность проектной работы определяется возможностью выразить личное отношение учащегося к окружающему миру и его улучшения [38].

Преобразовательная компонента проектной деятельности сводится к реализации процессов преобразования окружающего мира, для достижения удовлетворения определенных потребностей как самого человека, так и окружающих. Проектная деятельность использует различные техники для изменения и улучшения уже существующего или же на создание нового объекта.

По мнению ученых (М.С. Каган и др.), преобразовательная компонента проектной деятельности может быть реализована с помощью различных форм. Выбор формы преобразовательного действия зависит от характера объекта (преобразование природы, общества, самопреобразование человека и др.) [17, 31].

Коммуникативная компонента проектной деятельности может включать способы и средства и навыки общения, которые необходимы для передачи устной информации и эмоционального окрашивания речи учащихся. В контексте проектной деятельности это означает, что в процессе формируется навык эффективного общения, который включает умение слушать и воспринимать информацию, задавать вопросы, выражать идеи и мысли, а так же развивает способность выражать мысли в зависимости от контекста и аудитории.

Изучение проектной деятельности как целостной системы подразумевает анализ основ взаимосвязей и зависимостей ее элементов. Важным аспектом в проектной деятельности является определение ее сути как «проектной» и понимание взаимосвязи между целью и самим процессом деятельности.

В современной литературе представлено более 50 определений понятий «проект», «проектирование». Исследование различных интерпретаций позволило прийти к выводу что, в целом проект воспринимается как цель и продукт деятельности, а проектирование как процесс этой деятельности. По общепринятым нормам, целью и результатом проектной деятельности должен быть определенный продукт.

Проектная деятельность отличается тем, что она предполагает уникальный подход к решению конкретной задачи на основе определенных исходных данных и целей. Каждый проект должен включать в себя постановку задачи (или проблемы), способы ее решения и конечные результаты – это может быть уникальный продукт или услуга, создаваемые в рамках ограниченных временных и ресурсных рамок. В результате проектной деятельности происходит последовательное изменение объекта как качественно, так и количественно, приводящее к получению нового уникального результата, не имеющего аналогов. Подходы к проектной деятельности могут быть структурными и функциональными в своей

сущности. При описании проектной деятельности как процесса, мы можем использовать разные подходы: структурный и функциональный.

Л.В. Мардахаев говорит, что структурный подход основан на выделении определенных этапов проектной деятельности, а функциональный подход подразумевает определение содержания: диагностико-прогностический, этап выбора технологии, непосредственной подготовки, реализационный и оценочно-результативный [25].

При реализации деятельностного подхода в практической проектной деятельности в школе, стоит опереться на систему дидактических принципов, которые могут различаться для разных тематических направленностей:

- Принцип деятельности – основан на том, что учащиеся, получают знания не в готовом виде, а, добывают их сами, осознавая при этом содержание и формы своей учебной и практической деятельности, что способствует лучшему формированию его способностей, общеобразовательных умений.

- Принцип непрерывности – заключается в преемственности между всеми этапами обучения с учетом психолого-возрастных особенностей развития школьников. Непрерывность процесса обеспечивает различными технологии, а также преемственностью между всеми ступенями обучения содержания, методов и приемов.

- Принцип минимакса – заключается в том, что образовательное учреждение должно предложить учащемуся варианты освоения содержания образования на максимальном для него уровне и обеспечить при этом его усвоение на базовом уровне государственного стандарта знаний.

- Принцип целостности – предполагает формирование учащимися системного представления о мире, о роли и месте каждой науки в системе наук. У ребёнка должно быть сформировано обобщённое, целостное представление о мире (природе – обществе – самом себе), о роли и месте каждой науки в системе наук.

- Принцип вариативности – предполагает формирование учащимися способностей к адекватному принятию решений в ситуациях выбора, развитие у учащихся вариативного мышления, то есть понимания возможности различных вариантов решения проблемы, формирование способности к систематическому перебору вариантов и выбору оптимального варианта.

- Принцип психологического комфорта – заключается в создании дружелюбной атмосферы, использовании диалога как формы взаимодействия, важно чтобы происходила нейтрализация всех стрессообразующих факторов учебного процесса.

- Принцип творчества – означает максимальную ориентацию на творческое начало в образовательном процессе, приобретение ими собственного опыта творческой деятельности.

В 1926 году в своей книге «Педагогическая психология» Л.С. Выготский, писал, что в новой педагогике жизнь «раскрывается как система творчества. Каждая наша мысль, каждое наше движение и переживание являются стремлением к созданию новой действительности, прорывом вперед к чему-то новому». Для этого и сам процесс учения должен быть творческим. [24, 25].

С методической точки зрения можно выделить несколько этапов работы над созданием исследовательского проекта:

- определение темы проекта;
- определение проблемы и цели проекта;
- обсуждение структуры проекта, составление примерного плана работы;
- презентация необходимого материала;
- поиск информации: работа с разнообразными источниками, создание собственной системы сохранения информации;
- групповая работа; регулярные встречи, во время которых обучающиеся обсуждают промежуточные результаты;

- анализ собранной информации, координация действий различных групп обучающихся;
- подготовка презентации проекта;
- демонстрация результатов проекта (защита проекта);
- коллективное обсуждение проекта [20].

1.2. Цели и задачи проектной деятельности в школе

Применение проектного метода обучения позволяет школьникам приобретать практический опыт, основанный на применении теоретических знаний в практической деятельности. При работе над проектом, развиваются различные универсальные учебные действия (УУД):

- самостоятельное выделение и формулирование цели исследования;
- поиск и выявление необходимой информации; применение методов информационного поиска, в том числе с помощью компьютерных средств;
- структурирование знаний;
- осознанное и произвольное построение речевого высказывания в устной и письменной форме;
- выбор наиболее эффективных способов решения задач в зависимости от конкретных условий;
- рефлексия способов и условий действия, контроль и оценка процесса и результатов деятельности;
- определение основной и второстепенной информации; свободная ориентация и восприятие текстов художественного, научного, публицистического и официально – делового стилей;
- понимание и адекватная оценка языка средств массовой информации;
- постановка и формулирование проблемы, самостоятельное создание алгоритмов деятельности при решении проблем творческого и поискового характера.

При подготовке к проведению научно-исследовательской работы со школьниками педагогу важно правильно сформулировать цели и задачи организуемой проектной деятельности.

В общем виде цель проектной деятельности заключается в познании и использовании обучающимися навыков, умений и знаний, которые приобретены ими в ходе изучения различных предметов (на интеграционной основе). Для достижения данной цели, необходимо реализовать ряд обучающих, развивающих и воспитательных задач, которые педагог может определить самостоятельно, исходя из выбора направления проекта [16].

1.3. Проектная деятельность в школах Пензенской области

Мы изучили доступную информацию о вариантах и методах проведения исследовательских проектов в школах г. Пензы. Во всех учебных заведениях положение о проектной деятельности обучающихся являются локальным нормативным актом, который регламентирует алгоритмы работы, процедуру, требования и систему оценивания индивидуального итогового проекта на уровне среднего общего образования. Наиболее удачными и полными нам показались положения о проектной деятельности в нескольких учебных заведениях г. Пензы: Гимназия №1 Ступени и Губернский лицей. Их мы решили рассмотреть подробнее.

Гимназия №1 Ступени определяет для себя проектную деятельность учащихся как основную процедуру итоговой оценки достижения междисциплинарных, метапредметных результатов полученных учащимися. Презентация итогового индивидуального проекта, может рассматриваться как допуск к государственной итоговой аттестации. Губернский Лицей в свою очередь проектную деятельность учащихся считает одним из методов развивающего (личностно-ориентированного) обучения, – направленный – на выработку самостоятельных исследовательских умений (постановка

проблемы, сбор и обработка информации, проведение экспериментов, анализ – полученных результатов), способствующий – развитию – творческих способностей и логического мышления, который объединяет знания, полученные в ходе учебного процесса и приобщает к конкретным жизненно важным проблемам.

Целью проектной деятельности в основном, является возможность продемонстрировать достижения учащихся в самостоятельном освоении методов и форм избранных областей знаний, способность проектировать и осуществлять целесообразную и результативную деятельность.

Среди задач проектной деятельности можно выделить несколько, которые являются общепринятыми в рассматриваемых учебных заведениях:

Одна из задач – обучение планированию (учащийся должен - уметь четко определить цель, описать основные шаги по ее достижению, концентрироваться на достижении цели, на протяжении всей работы);

Следующей задачей будет – формирование навыков сбора и обработки информации, материалов (учащийся должен уметь выбрать подходящую информацию и правильно ее использовать);

Третья задача заключается в развитии у учащихся умения анализировать (креативность, критическое мышление);

Четвертая задача – учащийся должен уметь составлять план работы, четко презентовать информацию, согласно правилам оформлять список литературных источников, иметь понятие о библиографии;

Формирование позитивного отношения к работе (учащийся должен проявлять инициативу, энтузиазм, стараться выполнить работу в срок, в соответствии с установленным планом и графиком работы).

Итоговый проект представляет собой учебный проект, выполняемый обучающимся в рамках одного из учебных предметов или на межпредметной основе с целью продемонстрировать свои достижения в самостоятельном освоении содержания избранных областей знаний и/или видов деятельности и способность проектировать и осуществлять целесообразную и

результативную деятельность (учебно-познавательную, конструкторскую, социальную, художественно-творческую и др.). Выбор темы итогового проекта осуществляется обучающимися.

Результатом (продуктом) проектной деятельности может быть одна из следующих работ:

1. письменная работа (эссе, реферат, аналитические материалы, обзорные материалы, отчеты о проведенных исследованиях, стендовый доклад и др.);
2. художественная творческая работа (в области литературы, музыки, изобразительного искусства, экранных искусств), представленная в виде прозаического или стихотворного произведения, инсценировки, художественной декламации, исполнения музыкального произведения, компьютерной анимации и др.;
3. материальный объект, макет, иное конструкторское изделие;
4. отчетные материалы по социальному проекту, которые могут включать как тексты, так и мультимедийные продукты.

Требования к организации проектной деятельности, к содержанию и направленности проекта, а также критерии оценки проектной работы разрабатываются с учетом целей и задач проектной деятельности на данном этапе образования и в соответствии с особенностями образовательной организации.

Общим требованием ко всем работам является необходимость соблюдения норм и правил цитирования, ссылок на различные источники. В случае заимствования текста работы (плагиата) без указания ссылок на источник проект к защите не допускается.

Для оценки результатов индивидуальной проектной деятельности разрабатывается специальная школьная комиссия. Защита проектов может проходить в формате конференции школьной или региональной, в зависимости от учебного заведения.

Учащийся должен предложить свой продукт (результат) с описанием и презентовать его комиссии, заранее предоставив отзыв эксперта.

Критерии оценки проектной работы разрабатываются с учетом целей и задач проектной деятельности на данном этапе образования. Проектную деятельность целесообразно оценивать по следующим критериям:

Способность к самостоятельному приобретению знаний и решению проблем, проявляющаяся в умении поставить проблему и выбрать адекватные способы её решения, включая поиск и обработку информации, формулировку выводов и/или обоснование и реализацию/апробацию принятого решения, обоснование и создание модели, прогноза, макета, объекта, творческого решения и т.п. Данный критерий в целом включает оценку сформированности познавательных учебных действий.

Сформированность предметных знаний и способов действий, проявляющаяся в умении раскрыть содержание работы, грамотно и обоснованно в соответствии с рассматриваемой проблемой/темой использовать имеющиеся знания и способы действий.

Сформированность регулятивных действий, проявляющаяся в умении самостоятельно планировать и управлять своей познавательной деятельностью во времени; использовать ресурсные возможности для достижения целей; осуществлять выбор конструктивных стратегий в трудных ситуациях. Сформированность коммуникативных действий, проявляющаяся в умении ясно изложить и оформить выполненную работу, представить её результаты, аргументированно ответить на вопросы.

ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Влияние антибиотиков на окружающую среду

В XX веке антибиотики произвели революцию в лечении инфекционных заболеваний. Но на сегодняшний день бесконтрольное и не всегда правильное применение препаратов данного класса, привело к возникновению и распространению устойчивости к антибиотикам. Данная ситуация актуальна для всего мира. Большинство развитых стран разрабатывают стратегии по борьбе с данной проблемой.

В докладе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) говорится о том, что в недалеком будущем общество столкнется с проблемой устойчивости к антибактериальным препаратам лицом к лицу, и антибиотикорезистентность будет расти быстрее, чем разрабатываться антибактериальные препараты, а существующие штаммы выработают устойчивость к уже имеющимся. Все это может привести к глобальным проблемам, даже простое медицинское вмешательство будет сопряжено с высоким риском возникновения инфекции, может повыситься количество летальных исходов медицинских операций и инвалидизации пациентов, нагрузка на систему здравоохранения значительно увеличится.

По данным Европейского Центра профилактики и контроля заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control), устойчивость бактерий к антибиотикам ежегодно становится причиной более чем 25 тыс. смертей в одной только Европе.

Причины роста устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам обусловлены множеством факторов: естественным процессом эволюции бактерий, необоснованностью использования фармацевтических антибиотиков и их широкой доступностью для человека, а также использованием в сельском хозяйстве.

Все чаще при исследовании сельскохозяйственных угодий, грунтовых вод, питьевой воды, а также сточных вод, там обнаруживаются антибиотики.

Основными факторами, увеличивающими количество антибиотиков в почвах, является их использование в сельскохозяйственном производстве. В агрономии антибиотики применяются часто в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений. Также антибиотики имеют широкое применение в животноводстве, в качестве препаратов для профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями и стимуляции роста у крупного рогатого скота и птицы. Одной из причин попадания антибиотиков в почву является сброс сточных вод предприятиями занимающимися производством медицинских антибиотиков или производством гербицидов и удобрений, а также благодаря использованию навоза в качестве удобрения и орошения, сельскохозяйственных полей.

В последнее время, в связи с развитием животноводства и рыбоводства наблюдается значительный рост использования тетрациклинов. По масштабам применения, они занимают одно из первых мест среди других антибиотиков, используемых в ветеринарии. Согласно литературным данным, в США используют более 3 тыс. тонн антибиотиков тетрациклиновой группы. ежегодно, а в Европе – более 2,5 тыс. тонн.

В ходе исследований проводимых в США установлено, содержание тетрациклинов в почвах от 2,8 до 243 мкг/кг, иногда обнаруживаются и более высокие концентрации [42, 43, 44, 45].

В Европейском союзе утверждены предельно допустимые концентрации, составляющие 200 мкг/кг для яиц, мяса животных, птицы и 100 мкг/л для молока. Однако отсутствуют соответствующие нормативы для объектов окружающей среды, в том числе, почв, ввиду неоднозначного и недостаточного количества исследований по оценке экотоксичности антибиотиков на их биологические свойства. В России антибиотики, в отличие от пестицидов, долгое время не рассматривались в качестве

загрязнителя. А в российских публикациях не встречалось исследований о влиянии антибиотиков на биологические свойства почв.

Присутствие тетрациклинов в объектах окружающей среды, особенно в продуктах питания животного и растительного происхождения оказывает не только отрицательное воздействие, на здоровье человека, приводя к резистентности, но и нарушает столь шаткий экологический баланс в экосистемах.

При попадании в окружающую среду антибиотики способны оказывать воздействие на микробные сообщества экосистем благодаря своим бактерицидным и бактериостатическим свойствам. Что в свою очередь приводит к снижению полезных бактерий, улучшающих плодородие почв. К настоящему времени исследовано воздействие антибактериальных препаратов различных групп на структурное, функциональное, генетическое разнообразие и обилие почвенных микроорганизмов, а также на осуществляемые ими процессы [4].

Среди отечественных ученых мы обнаружили работы Ю.В. Акименко, Трифановой Т.А. и др. Чесноковой С.М. в которых изучено влияние антибиотиков на микробиоту почв. В данных работах описано влияние антибиотиков на азотофиксирующие, амилалитические, аммонофицирующие бактерии и микромицеты [4, 36, 39].

2.2. Роль азотофиксирующих бактерий в природе

Еще в Древней Греции и Риме были известны работы философов Теофраста, Катон, Варрон, Плиний и Вергилий, которые были посвящены повышению плодородия почв. В те же времена было замечено, что некоторые растения способствуют повышению урожая. Но первые догадки по этому вопросу высказал французский агрохимик Дж. Буссенго, лишь в 1838 году. Он доказал, что некоторые растения семейства бобовые (люцерна

и клевер) обогащают почву азотом, а зерновые и корнеплоды, напротив, истощают ее. Он ошибочно полагал, что это накопление азота происходит в листьях бобовых растений. Проведя ряд опытов по проращиванию семян бобовых на стерильных почвах, он не получил нужного результата. В дальнейшем, он сам отказался от своей теории.

В 1901 году голландский учёный Мартин Бейкеринк открыл азотобактер – граммотрицательную, аэробную бактерию, живущую в почве и способную в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усвоения растениями [32, 40]. Через несколько лет немецко-американский биохимик Фриц Альберт Липман (1903) открыл и описал еще один вид бактерий – *Azotobacter vinelandii* Lipman. А в 1904 году, он же описал еще один вид бактерий, которые впоследствии были названы в честь Бейеринка. Советский ученый, микробиолог Н.А. Красильников в 1949 году описал вид, который был назван – *Azotobacter nigricans* Krasilnikov, который впоследствии был разделен на 2 подвида (*Azotobacter nigri canssub sp. Nigricans* Krasilnikov, и *Azotobacter nigri canssub sp. Achromogenes* Thompson and Skerman.).

Уже в 21 веке были уточнены филогенетические связи бактерий рода *Azotobacter*, и ученые выяснили, что *Azotobacter vinelandii* принадлежат к одному и тому же классу с бактерией *Pseudomonas aeruginosa*. В 2007 году ученые предположили близость родов *Azotobacter*, *Azomonas* и *Pseudomonas* [40].

На сегодняшний день род включает 6 видов и современная систематика азотобактера выглядит следующим образом:

Отдел	Gracilicutes
Класс	Scotobacteria
Семейство	Azotobacteriaceae
Род	Azotobacter

Виды *Az. chroococcum*, *Az. agile*, *Az. vinelandii* и др (рис 1, 2).

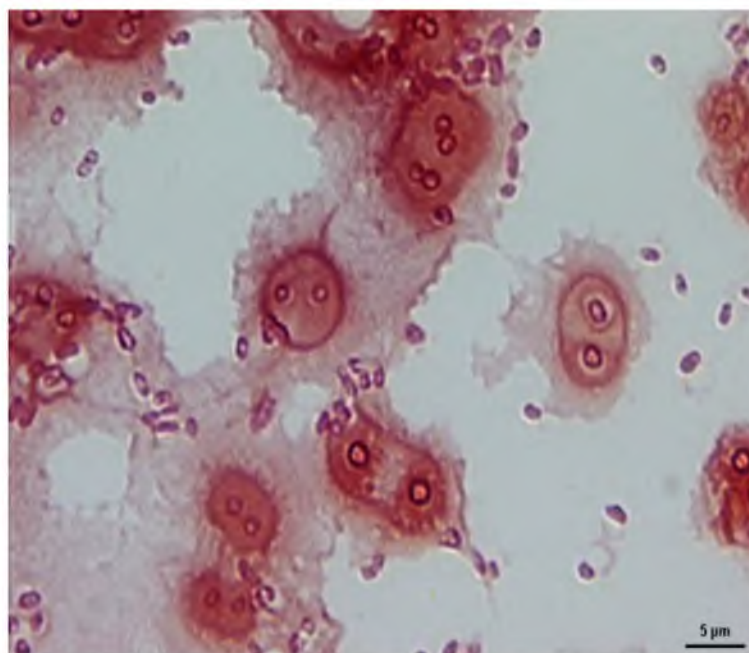


Рисунок 1. *Azotobacter vinelandii*



Рисунок 2. *Azotobacter chroococcum*

Бейкеринк в начале XX века утверждал о сходстве азотофиксирующих бактерий и сине-зеленых водорослей, он дал организму название *Azotobacter chroococcum* (с латинского – коричневеющий кокк), что отражает сходство

двух организмов: округлую форму клетки и способность выделять коричневый пигмент [40].

Бактерии рода *Azotobacter* характеризуются своеобразными морфологическими свойствами, сочетающими признаки палочек и кокков. Клетки молодых культур имеют форму утолщенных палочек с овальными концами. Чаще они бывают сцеплены попарно. Размеры составляют 2,5-6*1,5-3 мкм. Цитоплазма гомогенная, мелкозернистая, нуклеоид компактный, обычно располагающийся в центре клетки. Молодые клетки подвижны, движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. Кроме жгутиков, на поверхности клетки располагаются нитевидные структуры – фимбрии, служащие агрегации клеток и прикрепления их к твердым субстратам [19]. На твердых питательных средах, не содержащих азотных соединений, азотобактер образует крупные прозрачные, слизистые, гладкие, иногда морщинистые колонии.

Молодые клетки азотобактера имеют мелкозернистую плазму. С возрастом плазма становится более зернистой и появляются зерна, которые имеют разную природу, чаще всего это капли жира или метахроматические включения. Они резко преломляют световые лучи. Клетка укорачивается и становится коковидной формы, а также теряет свою подвижность. Установлены клетки гигантские клетки шаровидной формы, но могут встречаться совсем небольшие, до 0,2 мк. При дальнейшем развитии клетка или собрание из нескольких клеток покрываются толстой оболочкой из слизи, которая содержит полисахариды и незначительное количество азота (0,023%), основное вещество слизи – ангидрид уксусной кислоты, который составляет более 70 %. В таком виде клетки азотобактера устойчивы ко многим бактериологическим и физическим факторам среды. При старении клеток азотобактера в них образуется пигмент, поэтому цвет может варьироваться от светло-желтого до темно коричневого, как у *Az. chroococcum* и от зеленоватого и флуорисцирующего, как *Az. agile* и до розово-фиолетового у *Az. vinelandii*. Различия в цвете обуславливаются

различными условиями и используемой питательной средой. [5, 13, 26, 30]. Грам-, каталазоположительные бактерии, хорошо растут в аэробных условиях, оптимальная температура между 25-30°C, пределы pH 7,0-7,5 [31].

Таким образом, можно сказать, что распространение азотобактера во многом определяется содержанием органических соединений в почвах, нейтральной кислотностью, оптимальным увлажнением, и наличием ряда макро и микроэлементов необходимых для питания бактерий (фосфор, кальций, молибдена, магния и железа) [9, 21].

Азотобактер является важным показателем культурности почв, повышают плодородность и урожайность сельскохозяйственных культур. А применение азотобактерий в качестве удобрений давно применяется в растениеводстве, является одним из безопасных и экологических способов повышения урожайности. Может снизить зависимость сельского хозяйства от использования химических удобрений, пестицидов, антибиотиков.

На целинных почвах, подзолистых или дерно-подзолистых азотобактер встречается редко. Так как, эти почвы бедны гумусом (0,3-0,5%), достаточно кислые (pH=4,0– 4,5), существование в них азотификсирующих бактерий затруднено. При окультуривании таких почв условия для развития азотобактера улучшаются; вносимые органические и минеральные фосфорные удобрения стимулируют размножение азотобактера, а азотные минеральные в высоких дозах - подавляют его рост [9, 21, 32].

В кислых подзолистых почвах бактерия практически не встречается, а выделенные немногочисленные колонии оказываются ослабленными.

Для серых лесных почв содержание азотобактерий в максимальном значении характерно в период весны, лета, при достаточном увлажнении и благоприятном температурном режиме.

Считается, что светло-серые лесные почвы имеют схожие свойства с дерново-подзолистыми почвами, что подразумевает равное распространение азотобактерий в них. В то же время темно-серые почвы по своему

органическому составу близки к оподзоленным и выщелоченным чернозёмам. [2].

Азотобактер процветает в почвах с луговой растительностью, где преобладают растения семейства бобовые, а влажность остается на высоком уровне в течение всего вегетационного периода. Такие почвы включают в себя почвы пойм, где в подзолистой зоне созданы благоприятные условия и содержится достаточное количество питательных веществ.

Для почв болотно-низинных характерно сниженное содержание азотобактера, размножение затруднено, это связано с тяжелыми водно-воздушными условиями, а так же недостатком микроэлементов, кальция, фосфора [2].

Для торфяников наличие азотобактерий не характерно, хотя в низинных целинных торфяных болотистых почвах иногда азотобактер встречается, это связано в первую очередь с высоким закислением, некоторые торфа для азотобактерий токсичны [2].

Черноземы – это нейтральные или слабощелочные почвы с высоким содержанием солей кальция и магния. Чернозёмы отличаются высокой активностью азотофиксирующих бактерий. Наиболее интенсивно развиваются весной и рано летом, при наличии благоприятных температурных условий и достаточного уровня увлажнения, в более северных районах, азотобактер развивается в течение всего вегетационного периода. Стоит отметить, что на черноземах южных азотобактер развивается реже, что связано с тем, что в летнее время почвы содержат довольно много органики. Наиболее часто азотобактер встречается в черноземных почвах лугов долин рек. Наиболее благоприятными оказывается лучше, чем в оподзоленных [10].

На целинных, неполивных или окультуренных каштановых почвах свободноживущие азотофиксирующие бактерии активно развиваются только лишь весной, при достаточном увлажнении, при засушливых погодных условиях обнаруживается редко.

В зоне сероземов азотобактерии обнаруживаются лишь ранней весной, по мере засоления почвы развивается реже. некоторые источники свидетельствуют, что данный род бактерий более чувствителен к содовому засолению и менее к сульфатно-хлоридному [28].

Для окультуренных подзолистых почв, которые образованы на суглинках, характерна довольно благоприятная среда для роста азотобактера. Благоприятный водно-воздушный режим и слабокислая реакция ($pH=5,5$), является хорошей базой для развития микрофлоры почв [28].

Для почв тропической зоны характерно достаточное количество влаги и низкая pH , азотобактерии в данных условиях вытесняются другими, более кислотоустойчивыми бактериями.

В условиях средней полосы России, на окультуренных огородных почвах азотобактер обычно находится в достаточном количестве [27].

Таким образом, азотобактер может служить индикатором степени окультуренности почвы [27]. Наличие азотобактера в почве оказывает значительное влияние на сельское хозяйство. Можно выделить основные роли, которые азотобактер играет в сельском хозяйстве:

1. Фиксация азота: Одна из основных ролей азотобактера заключается в фиксации атмосферного азота. Эти бактерии обладают ферментом, называемым азотфазой, который способен превращать атмосферный азот в аммиачную форму, доступную для растений. Это позволяет растениям получать дополнительный источник азота, что способствует их росту и развитию.

2. Улучшение почвенной структуры: азотобактер способствует улучшению структуры почвы. Они вырабатывают полисахариды и другие экзополимеры, которые помогают связывать частицы почвы в более крупные агрегаты. Это улучшает водоудерживающую способность почвы, облегчает проникновение воды и воздуха, а также повышает ее плодородие.

3. Улучшение доступности питательных веществ: азотобактер также секретирует различные ферменты и органические кислоты, которые

способствуют растворению минеральных соединений в почве. Это помогает улучшить доступность питательных веществ для растений, таких как фосфор, калий и микроэлементы. В результате, улучшается питательный статус растений и их способность к более эффективному поглощению питательных веществ.

4. Борьба с патогенными микроорганизмами: Некоторые штаммы азотобактера проявляют антагонистическую активность против патогенных микроорганизмов, таких как фитопатогенные грибы и бактерии. Они выделяют антибиотики и другие вещества, которые могут замедлять рост и развитие патогенов, что способствует повышению здоровья растений [27].

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оборудование и реактивы для проведения исследования

Оборудование и реактивы для исследовательского проекта подбирались таким образом, чтобы в условиях школьного кабинета биологии и химии проведение данного исследования было возможным.

Перечень необходимого оборудования включает в себя:

- Микроскоп с возможностью увеличения до 1000х для микробиологического анализа.
- Лабораторная посуда: пробирки, чашки Петри, плоские, колбы пипетки и другая необходимая посуда.
- Инвентарь для отбора проб: лопатка или нож, стерильный контейнер или зип пакет.
- Химические реактивы и препараты: сахароза или глюкоза, калий сернокислый, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций углекислый, магний сернокислый, натрий хлористый, агар-агар, красители (фуксин Циля, тушь), антибиотики широкого спектра действия (торговые названия – клафоран, амоксиклав, тетрациклин).

3.2. Описание методики проведения исследования

В рамках проектной деятельности школьников согласно положению о проектной деятельности школы № 76 г. Пензы совместно с учителем биологии Сухановой Е.В. был разработан план исследования «Влияние антибиотиков на рост культуры *Azotobacter*».

Цель создания школьного исследовательского проекта «Влияние антибиотиков на рост культуры *Azotobacter*» сформировать у учащихся

навыки самостоятельного освоения навыков и умений, способность проектировать и осуществлять научно-поисковую деятельность.

Задачи проектной деятельности:

Обучающие:

- Получить более глубокие знания на тему – бактерии, изучить их строение и классификацию и роль в жизни человека;
- Сформировать навык сбора и обработки информации, материалов;
- Развивающие:
- Развить умение анализировать полученную информацию;
- Получить опыт практической лабораторной деятельности.
- Воспитательные:
- сформировать опыт позитивного отношения к работе;
- сформировать желание проявлять целеустремленность и системность в учебной деятельности;
- повысить самооценку учащихся, благодаря достижению поставленной цели;

Для его внедрения мы провели все исследования в лабораторных условиях, для того чтобы убедиться, что условий школьного кабинета биологии достаточно, для проведения подобного исследования.

Для удобства учащихся весь ход работы был разделен на ряд этапов.

На **первом** этапе научно-практической работы учащихся определена тема работы, цели и задачи, гипотеза, а также сформулирована проблема которую можно решить с помощью данной работы – актуальность.

Например: Цель проекта: выявить влияние антибиотиков на культуру азотобактера.

Гипотеза проекта: в литературных источниках имеются сведения о том, что природные непатогенные прокариоты имеют устойчивость к антибиотикам [3].

Актуальность данной темы обусловлена значительным распространением явления антибиотикорезистентности, в связи с широким и иногда избыточным применением антибиотиков как в медицине, так и в сельском хозяйстве. Азотобактер имеет важное хозяйственно-биологическое значение. Изучение его свойств поможет глубже понимать некоторые процессы происходящие в почве.

Задачи проекта:

1. Изучить влияние антибиотиков на окружающую среду.
2. Вырастить культуру азотобактера.
3. Провести микробиологический анализ колоний.
4. Провести микроскопирование и увидеть отдельные клетки азотобактера.
5. Сделать вывод о влиянии антибиотиков на бактерии рода *Azotobacter*.

После, провели анализ литературных данных и познакомились с объектом исследования, в нашем случае это азотофиксирующие бактерии – азотобактер. Учащиеся собрали и проанализировали предложенные учителем материалы. На этом этапе познакомились с такими понятиями как: бактерия, окраска по Граму, среда Эшби, азотофиксация, а также изучили роль бактерий в жизни человека.

На **втором** этапе произвели отбор почвенных проб. Пробы отбирались в весеннее, летнее время, при достаточном увлажнении. Из инвентаря необходимо иметь лопатку или нож, предварительно стерилизованный спиртовым раствором. Отбор проб производился с глубины 3-15 см, пробы были помещены в специальную емкость, обязательно подписанную. Хранятся пробы в холодильнике.

Для нашего исследования мы провели отбор проб с трех участков, в трех повторностях.

Следующий (**третий**) этап – подготовка образца к микробиологическому анализу заключается в том, что образцы просушили,

предотвратив их смешивание. Из почвы удалили крупные частицы, корешки, камни. Почву каждого образца перемешали и разложили ровным слоем на бумаге. После высушивания почву просеяли через сито с диаметром ячеек 1-2 мм.

Четвертый этап работы – посев. Для посева азотобактера использовали селективную питательная среда Эшби [12]. Для приготовления агаризованной среды Эшби использовали компоненты следующего состава: маннит, сахароза или глюкоза – 20,0 г, калий сернокислый - 0,2 г, калий фосфорнокислый двузамещенный – 0,2 г, кальций углекислый – 5,0 г, магний сернокислый – 0,2 г, натрий хлористый – 0,2 г, агар-агар – 15,0 г. Сухие компоненты растворили в 1000 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешали и нагрели до полного растворения агара. Приготовленную среду разлили в стерильные колбы. Готовые среды хранятся в защищенных от света условиях при температуре не выше 8°C в течение не более 14 дней. На заливку каждой чашки Петри использовано около 20 мл среды Эшби.

Также нами использовался трафарет для посева, для него взяли лист бумаги, диаметр которого чуть меньше чашки Петри, внутри были сделаны ячейки 1x1 см, как на рисунке 3. Стерильным пинцетом отбирали комочки почвы 2-3 мм и размещали в чашке Петри (в узлах трафарета). Для создания более влажной среды, чашки Петри поместили в полиэтиленовый пакет с мокрой ватой.

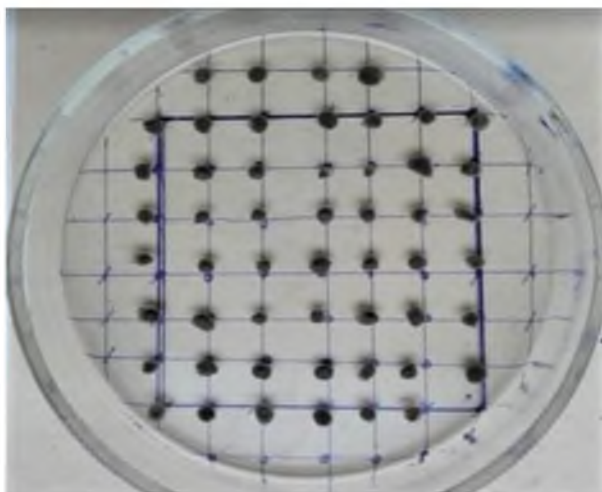


Рисунок 3. Схема расположения комочков земли в чашке Петри.

На **пятом** этапе мы наблюдали результаты роста колоний на 4,7 и 10 дни исследования и заносили их в таблицу (Таб. 1).

Таблица 1 – Лабораторный дневник эксперимента

Дата, время	Местоположение	Эксперимент	Цель	Оборудование
20.10.2023 - 25.10.2023	г. Пенза, Арбеково, ул. Куйбышева	отбор почвенных проб	отобрать пробы почв для посева на питательную среду	лопатку или нож, предварительно стерилизованный спиртовым раствором, контейнер или зип-пакет
20.10.23- 12.01.24	лаборатория КИМ	сушка отобранных образцов почвы	подготовка к почвы к посеву на питательную среду	-
13.01.2024	лаборатория КИМ	посев образцов на среду Эшби	Произвести посев на питательную среду Эшби для культивирования азотобактерий	чашка Петри, пинцет
19.01.2024	лаборатория КИМ	микроскопирование	изучить полученные колонии азотобактера под микроскопом	микроскоп, предметное, покровное стекло, красители
20.01.2024	лаборатория КИМ	посев на кривой агар	для получения накопительной культуры	пробирка, агар, бактериологическая петля

Таблица 1. Продолжение

27.01.2024	лаборатория КИМ	выделение чистой культуры	Произвести посев азотобактери й на питательную среду для получения чистой культуры и дальнейшего исследования	чашка Петри, спиртовка, бактериологическ ая петля, шпатель Дригальского
27.01.2024	лаборатория КИМ	установка бумажных дисков пропитанных антибиотиками в разной концентрации	установление влияния антибиотико в на азотобактер	Фильтровальная бумага, антибиотики в разных концентрациях

После того как колонии выросли (**шестой** этап) и данные занесены в таблицу исследовали культуры азотобактера под микроскопом.

Предметное стекло обработали спиртовой салфеткой для удаления загрязнений и жирового слоя. Из чашки Петри, с культурой на 6-7 день, выбрали несколько участков с разной окраской. При этом важно схематично отобразите в лабораторном журнале место взятия пробы, присвоили номер и зафиксировали цвет колонии.

С помощью зубочистки или стерильной иглы отобрали небольшое количество биомассы и перенесли на предметное стекло. Другим чистым стеклом одним резким движением размазали биомассу по центру стекла. Готовый микробиологический препарат просушили на воздухе пару минут или зафиксировали над огнем спиртовки.

С помощью пипетки Пастера на предметное стекло в центр площади, покрытой образцом, нанесли каплю фуксина Циля, и оставили для

окрашивания на 1 минуту. При нанесении красителей (туши и фуксина Циля) важно наносить минимально возможный объем красителя – это предотвратит сильное растекание образца по стеклу. Далее на край стекла, с помощью пипетки Пастера, нанесли каплю туши. Зубочисткой провели тонкую дорожку из капли с тушью до фуксина Циля, таким образом добавляя второй краситель. Перемешивали красители и биомассу, находящиеся на стекле, до равномерного тонкого слоя грязно-розового цвета. Получившийся препарат сушили на воздухе около 30 минут.

На готовый препарат нанесли каплю воды и рассматривали с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 100$ (объектив 40, окуляр 10);

Следующий – **седьмой** этап. С помощью метода культивирования на скошенный агар, выполнили посев для получения накопительной культуры. После разрастание культуры азотобактера произвели посев на питательную среду методом Дригальского для получения накопительной культуры и дальнейшего ее исследования.

В исследовании использовали три вида антибиотиков: **Цефалоспорины** – это группа β -лактамных антибиотиков, являющихся производными 7-аминоцефалоспоровой кислоты. Они оказывают бактерицидное действие, которое связано, как и у пенициллинов с нарушением образования клеточной стенки бактерий. Однако, цефалоспорины и пенициллинсвязывающие белки связываются с различными белками, что может являться причиной различий в спектре противомикробного действия одних и других, а также отсутствия полной перекрестной резистентности этих двух групп препаратов.

Пенициллины относятся к тому же классу β -лактамных антибиотиков.. Пенициллины являются первыми антибактериальными лекарственными средствами, разработанными на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Пенициллины классифицируются на природные и синтетические, которые синтезируются из культуральной жидкости и полусинтетические. Пенициллины (и все другие β -лактамные антибиотики)

обладают бактерицидным действием. Они нарушают синтез клеточной стенки бактерий.

Тетрациклины проникают в микробные клетки частично пассивной диффузией и частично энергонезависимым активным транспортом. Чувствительные микроорганизмы накапливают антибиотик внутри клеток. Оказавшись внутри клетки, тетрациклины обратимо связываются с 30S субъединицей бактериальной рибосомы, блокируя связывание аминоцил т-РНК с акцепторным участком на м-РНК-рибосомном комплексе. Это нарушает присоединение аминокислот к образующемуся пептиду. В итоге нарушается синтез белков микробной клетки и развивается бактериостатический эффект. Тетрациклины считаются антибиотиками с широким спектром антимикробной активности. Данная группа противомикробных препаратов имеет широкое применение, не только в медицине, но и в ветеринарии, животноводстве, рыбоводстве, а так часто применяется в сельском хозяйстве.

Таким образом, два антибактериальных препарата имеют схожий механизм действия – оказывают влияние на клеточную стенку бактерий, другой препарат по своему действию отличается, он действует на связывание аминоцил т-РНК с акцепторным участком на м-РНК-рибосомном комплексе.

Для выявления влияния антибиотиков на азотобактер произвели внесение в чистую культуру азотобактера антибиотиков диско-диффузным методом.

Метод является качественным. На газон из культуры помещали бумажные диски смоченные в антибиотиках, в разной концентрации. Далее инкубировали в течении нескольких суток. По зоне задержки роста можно определить влияние антибиотика на рост культуры азотобактера.

3.3. Методы измерения роста азотобактерий.

Колонеобразование

Для того, чтобы оценить количественные изменения в популяции азотобактерий можно использовать несколько методов:

Один из методов – колониобразование. Данный метод используется для оценки количества жизнеспособных клеток азотобактерий на твердой питательной среде. После инкубации культуры на питательной среде в течение определенного времени, колонии бактерий считаются и записываются. Данное измерение может быть проведено каждые 24 часа или по мере необходимости.

Другим, часто используемым, методом количественной оценки популяций азотобактера является – оценка общей биомассы азотобактерий. Для этого производят сушку и взвешивание всех образовавшихся колоний. Проба с культурой азотофиксирующих бактерий собирается и сушится до постоянной массы при определенной температуре (около 80°C). После сушки, биомасса взвешивается с помощью аналитических весов. Измерения проводятся через определенные промежутки времени (например, каждые 12 часов) для получения данных о росте. Частота и продолжительность измерений зависят от конкретных целей эксперимента.

В своем исследовании мы использовали метод колонеобразования для оценки популяций азотобактера. Так как он наиболее прост и подходит для реализации исследований в условиях школы. На 7 сутки после посева почв на питательную среду, мы смогли увидеть рост колоний азотобактера на комочках почв и подсчитать количество образовавшихся колоний и выявить их процентное отношение.

3.4. Методы оценки влияния антибиотических препаратов на бактерии рода азотобактер

Для оценки влияния антибиотических препаратов на микроорганизмы используются различные методы: метод блоков и лунок, метод диффузии в агар или диско-диффузный метод.

Использованный в работе диско-диффузионный метод (ДДМ), будучи одним из первых методов определения чувствительности к антибиотикам, до настоящего времени остается наиболее распространенным в практических бактериологических лабораториях. ДДМ определения чувствительности основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности среды. Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат и инкубируют при температуре 35°C в течение 18-24 часов (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Результаты микробиологического исследования

Проводя исследования по алгоритму, описанному в главе 3 мы решили выявить степень влияния антибиотиков на бактерии рода *Azotobacter*. Некоторые авторы (Мелконян, 1969, Акименко и др., 2013) полагают, что азотобактер может быть устойчив к антибиотикам. В данных исследованиях были использованы различные препараты: пенициллин, стрептомицин, биомицин, бензилпенициллин, нистатин, фарамицин [4] .

Отбор проб производили на трех участках города Пензы: возле заправочной станции, возле оживленной дороги, на клумбе возле лаборатории, (рис. 4), (табл.2). Отбор проб производился в осенний период 2023 года, температура воздуха составляла + 9°C .



Рисунок 4. Образцы почв

Через сутки рост не регистрировался ни на одной из питательных сред.

На 4 сутки можно было наблюдать колонии округлые, блестящие, непрозрачные, слизистой консистенции размером 1-2 мм, которые проявились на всех средах.

Активность роста культур оценивали на 7 день эксперимента: все образцы показали значительный рост колоний. Образцы с бактериальными обрастаниями были с ровными и кружевными краями, молочного цвета, которые затем приобрели кремовый оттенок. На отдельных комочках появились колонии темно-бурого цвета, что характерно для колоний *Azotobacter chroococcum*. Мы провели оценку колонеобразования и выявили лишь небольшое отличие роста колоний на почве собранной на клумбе возле больницы КИМ (64-75 %) по отношению к почве собранной у дороги М-5 (50-58 %) и у заправочной станции (56-64 %) (рис.5).

Микроскопирование препаратов проводилось на 7 сутки. Образец с участка темного цвета предположительно *Azotobacter chroococcum* (рис. 6).

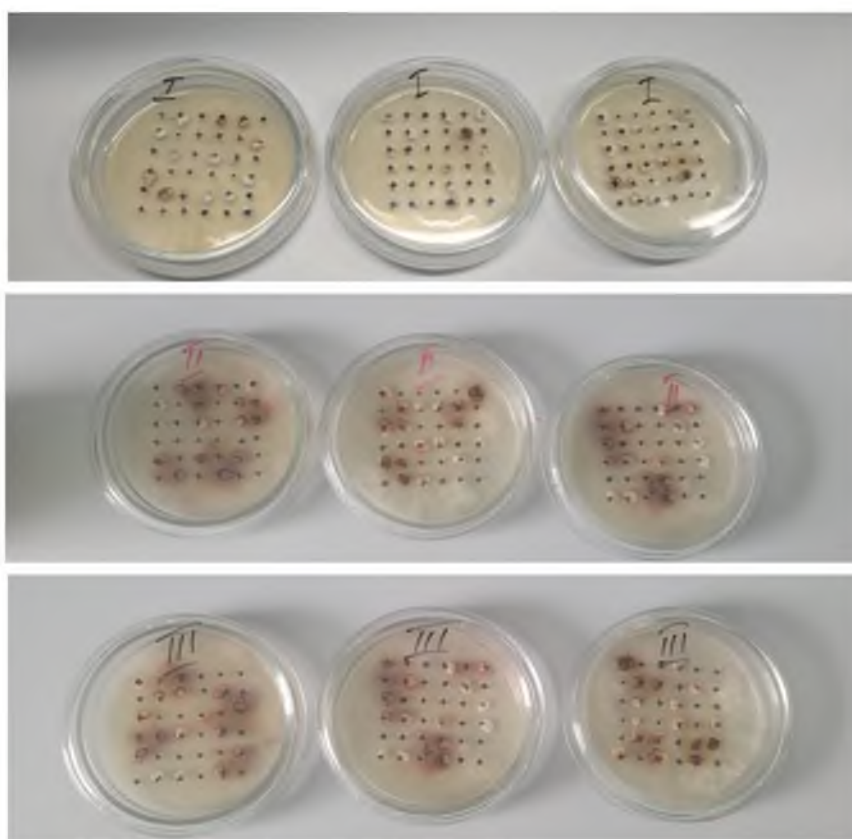


Рисунок 5. Рост культур азотобактера на различных почва

Таблица 2 - Отбор почвенных проб

Шифр	Расшифровка данных	Глубина взятия пробы. см	Описание рельефа, растительности и др.	Дата забора образца	Координаты	Фото местности
1/1	Г. Пенза, р-н Арбеково, возле дороги М5	10	Рельеф выровненный, растительность луговая, сильно нарушенная	20.10.23	53.236750, 44.882451	
1/2		12				
1/3		12				
2/1	Г. Пенза р-н. Арбеково, возле заправочной станции	10	Рельеф выровненный, растительность луговая	20.10.23	53.233528, 44.888201	
2/2		10				
2/3		10				
3/1	Г. Пенза, ул. Куйбышева 33а, КИМ	10	Рельеф выровненный, растительность культурная	25.10.23	53.177541, 45.004972	
3/2		10				
3/3		10				

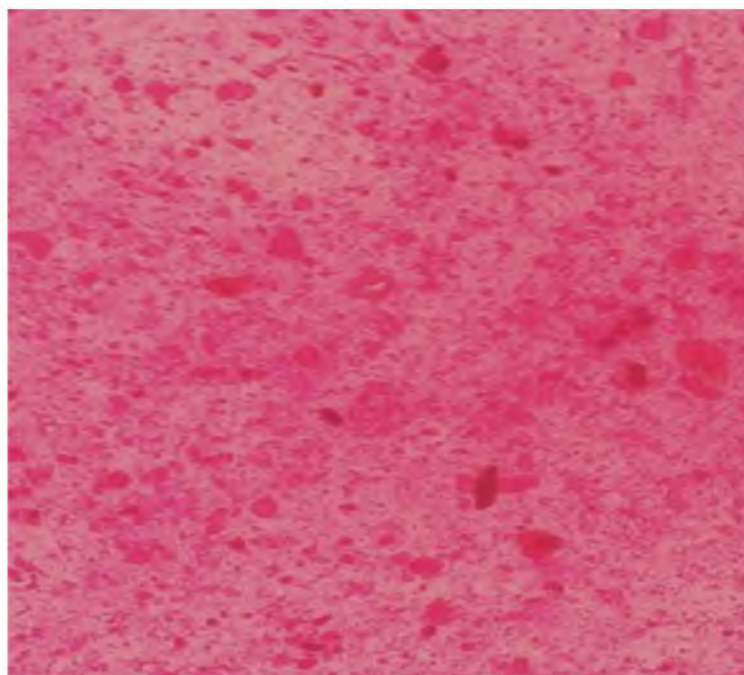


Рисунок 6. Результаты микроскопических исследований колоний бактерий *Azotobakter sp* (окраска по Граму)

Образцы с разных участков не показали кардинального отличия в росте колоний, лишь незначительно (рис.7, табл. 3, 4)

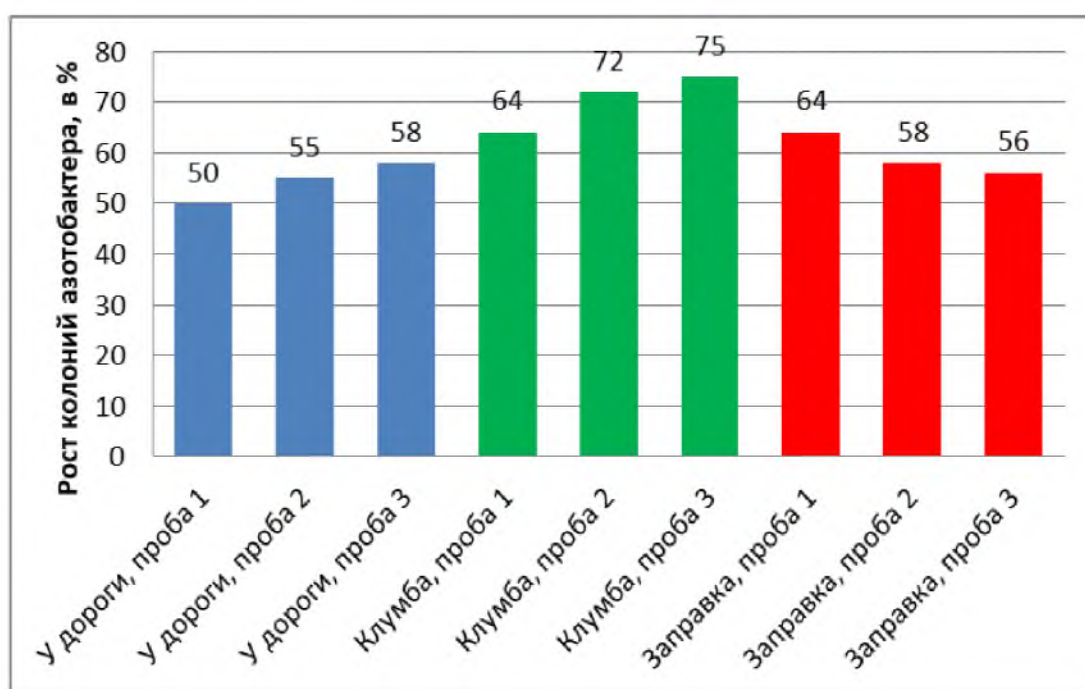


Рисунок 7. Рост колоний азотобактерий в зависимости от почв

Таблица 3 – Рост колоний азотобактерий в зависимости от почв

ИТОГИ				
Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
У дороги	3	163	54,33333333	16,33333333
Клумба	3	211	70,33333333	32,33333333
АЗС	3	178	59,33333333	17,33333333

Таблица 4 – Однофакторный дисперсионный анализ колонеобразования культуры азотобактера на различных почвах

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	402	2	201	9,136363636	0,01510421	5,14325285
Внутри групп	132	6	22			
Итого	534	8				

Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как P-Значение < 0,05, а критерий Фишера значим. Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия по количеству колоний азотобактера на различных почвах.

На следующем этапе работы мы выделили чистую культуру азотобактера на косом агаре и пересади его на питательную среду методом Дригальского для получения чистой культуры и исследования влияния на антибиотики. В каждую чашку Петри положили диски смоченные в растворах антибиотиков в разной концентрации.

Эксперимент проводили с фармацевтическими антибактериальными препаратами с различными действующими веществами, в разной концентрации (100, 200, 500 мг): цефалоспорин с торговым названием

клафоран, пенициллин (амоксициллин/клавуланат) с торговым названием амоксиклав, тетрациклин.

В результате мы получили чистые культуры азотобактерий выращенные на питательной среде в которую были введены антибиотики диско-диффузным методом. На всех образцах культура азотобактера получилась практически однородной и зон задержки роста вокруг дисков с антибиотиками не наблюдалось (рис 8).

Все сведения о ходе исследования фиксировались в лабораторном дневнике, куда вносилась информация о этапах исследования, необходимом оборудовании и методах применяемых в ходе исследования, что помогает структурировать весь ход проекта.

4.2. Обсуждение результатов экспериментальной части

Загрязнение почвы антибиотиками является важным показателем состояния окружающие среды. Антибиотики могут нарушать микрофлору почв, что неблагоприятно сказывается на растительности.

В ходе экспериментальной части были проведены опыты по выращиванию азотобактера на разных почвах, которые показали, что содержание азотобактерий в почве статистически различается. В пробе почвы с клумбы возле больницы КИМ больше (70,3 %), чем у дороги (54,3%) и у заправочной станции (59,3 %).

Это можно объяснить тем, что техногенная нагрузка не способствует развитию азотобактерий в почве. Наименьший рост свободноживущих азатофиксирующих бактерий наблюдается в местах с активным движением транспорта и загрязнениями тяжелыми металлами и горюче-смазочными материалами.

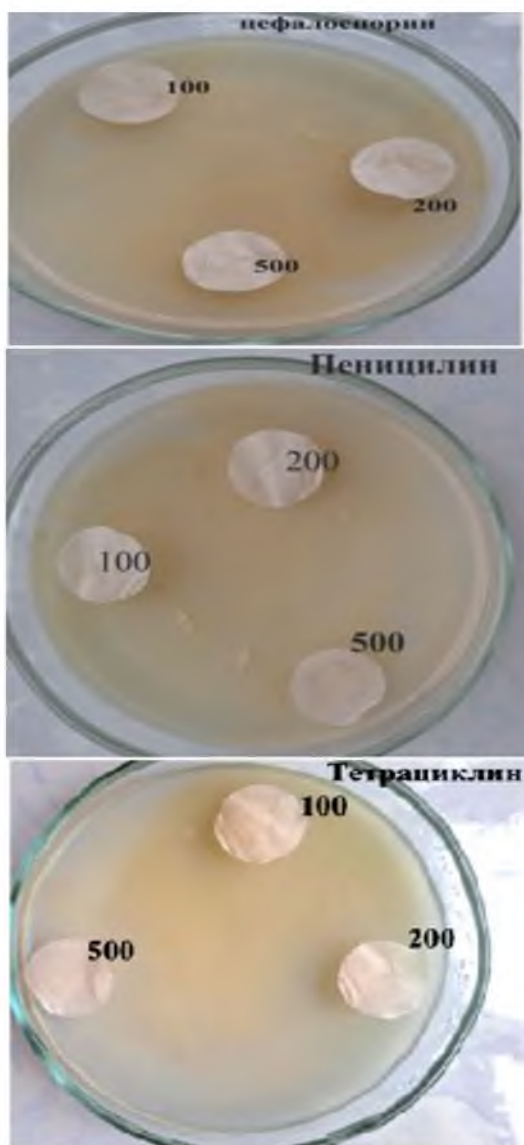


Рисунок 8. Влияние антибиотиков на бактерии рода *Azotobakter*

Влияние антибиотиков на свободноживущие азотофиксирующие бактерии не выявлено, причем нет различия в типах антибиотиков и их концентрациях.

Стоит отметить, что в рамках проведения исследования мы лишь разработали методику и апробировали ее. Необходимы более детальные и тщательные исследования влияния антибиотиков на почвенный микробиом.

Роль азотофиксирующих бактерий в ситуации возрастающей антибиотикорезистентности может быть значительной, так как при

использовании экологичных удобрений на основе азотобактерий, можно будет избежать чрезмерного использования антибиотиков в растениеводстве.

4.3. Обсуждение результатов образовательной части проекта

Разработанная нами научно-исследовательская работа полностью соответствует цели проектной деятельности сформулированной педагогом при ее подготовке, а также выполнены цели данной работы.

Результаты обучения в рамках исследовательской работы можно классифицировать как: образовательные, развивающие и воспитательные.

Образовательные. В процессе проведения исследований учащиеся познакомились с разделом биологии, который изучает микроскопические организмы – микробиология. Подробно изучили методы, которыми пользуется данная наука для исследований: метод биологических проб, культивирование, микроскопирование.

Познакомились с разнообразием бактерий, их классификацией, которая включает в себя: различия окраски по Граму (грамположительные и грамотрицательные); по отношению к кислороду (аэробные, анаэробные); по форме (палочки, кокки, спирохеты и др.).

Изучили строение бактериальной клетки азотобактерий, рассмотрели клеточную стенку, нуклеоид, цитоплазму, жгутики. Так же рассмотрели значительную роль азотофиксирующих бактерий в регуляции круговорота биогенных элементов (азота), их применение в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве и др. А также изучили важную глобальную проблему, связанную с распространением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Развивающие. В процессе работы школьники учились работать с текстами, анализировать их. Получили практические навыки работы в

лабораторных условиях со стерильными средами и микробиологическими инструментами.

Воспитательные. В процессе исследований у школьников формируется научное мировоззрение. Учащиеся получили опыт работы в группе, а так же развили чувство ответственности, самодисциплины, творческого отношения к делу.

ВЫВОДЫ

1. Проектный метод в школе является одним из лучших методов обучения, он позволяет школьникам приобретать практический опыт, основанный на применении теоретических знаний в практической деятельности. Служит для обучения планированию, формирования навыков сбора и обработки информации, помогает развивать умение анализировать (креативность, критическое мышление) А так формирует позитивное отношения к окружающей среде и научное мировоззрение.

2. На сегодняшний день бесконтрольное применение антибиотиков, привело к возникновению и распространению устойчивости к антибиотикам. Данная ситуация актуальна для всего мира. Причины роста устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам обусловлены множеством факторов: естественным процессом эволюции бактерий, необоснованностью использования фармацевтических антибиотиков и их широкой доступностью для человека, а также использованием в сельском хозяйстве. К настоящему времени недостаточно исследовано воздействие антибактериальных препаратов различных групп на структурное, функциональное, генетическое разнообразие и обилие почвенных микроорганизмов, а также на осуществляемые ими процессы.

3. Свободно живущие бактерии рода *Azotobacter* являются аэробами, живущими в почве и способны в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усвоения растениями. Азотобактер может служить индикатором степени окультуренности почвы. Наличие азотобактера в почве оказывает значительное влияние на сельское хозяйство, их применяют в качестве биоудобрений.

4. В процессе проведения исследований учащиеся познакомились с разделом биологии, который изучает микроскопические организмы – микробиология. Подробно изучили методы, которыми пользуется данная

наука для исследований: метод биологических проб, культивирование, микроскопирование. Познакомились с разнообразием бактерий, их классификацией, которая включает в себя: различия окраски по Граму (грамположительные и грамотрицательные); по отношению к кислороду (аэробные, анаэробные); по форме (палочки, кокки, спирохеты и др.). Изучили строение бактериальной клетки азотобактерий, рассмотрели клеточную стенку, нуклеоид, цитоплазму, жгутики. Так же рассмотрели значительную роль азотофиксирующих бактерий в регуляции круговорота биогенных элементов (азота), их применение в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве и др.

5. В ходе экспериментальной части были проведены опыты по выращиванию азотобактера на разных почвах, которые показали, что содержание азотобактерий в почве с клумбы возле больницы КИМ немного больше (70,3 %), чем у дороги (54,3 %) и у заправочной станции (59,3 %). Проверка значимости результатов дисперсионного анализа показывает, что нулевая гипотеза отвергается и влияние исследуемого фактора можно считать доказанным, так как $P\text{-Значение} < 0,05$, а критерий Фишера значим. Таким образом, имеются статистически значимые существенные различия по количеству колоний азотобактера на различных почвах. Это можно объяснить тем, что техногенная нагрузка не способствует развитию азотобактерий в почве. Наименьший рост свободноживущих азотофиксирующих бактерий наблюдается в местах с активным движением транспорта и загрязнениями тяжелыми металлами и горюче-смазочными материалами.

Влияние антибиотиков на свободноживущие азотофиксирующие бактерии не выявлено, причем нет различия в типах антибиотиков и их концентрациях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверин В.А. Психология личности. Санкт-Петербург: Изд-во Михайлова В.А., 2001. 145 с.
2. Агрохимия и почвоведение: учебник / под ред. В. М. Федорова и Н. А. Соколовой. Москва: КолосС, 2015. 227 с.
3. Акименко Ю. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Влияние загрязнения антибиотиками на биологические свойства чернозема обыкновенного. Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. 154 с.
4. Акименко Ю. В. Влияние фармацевтических антибиотиков на динамику численности почвенных микроорганизмов // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2014. №5 (183). С. 65-68.
5. Атлас по микробиологии: практикум / под ред. В. В. Войницкого и А. С. Молчанова. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 232 с.
6. Блинков Г. К. Азотобактер и его значение для высших растений. Томск: Издательство Томского университета. 1959. 123 с.
7. Брунер Дж. Психология познания. За пределами непосредственной информации. Москва: Прогресс, 1977. 413 с.
8. Брушлинский А. В. Проблемы психологии субъекта. Москва: Ин-т психологии РАН, 1994. 109 с.
9. Гегель Г. В.Ф. Наука логики // Энциклопедия философских наук: в 3 т. М.: Мысль, 1977. Т. 1. 452 с.
10. Гиляров М. С., Криволуцкий Д. А. Жизнь в почве. Москва: Мол. Гвардия. 1985. 191 с.
11. Горькая Ж. В. Психология ценностей. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2014. 92 с.
12. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического,

гельминтологического анализа. [Электронный ресурс] Электронный фонд правовой и нормативнотехнической документации. Введ. 01.01.1086. Москва. 1986. 7 с.

13. Дьюи Д. Психология и педагогика мышления / пер. с англ. Н. М. Никольской. [Электронный ресурс] Москва: Совершенство, 1997. 208 с. .
14. Зайцева Г.Н. Биохимия азотобактера. Москва: Наука. 1965.306 с.
15. Звягинцев Д.Г. Проблемы и методы биологической диагностики и индикации почв. Москва: Наука, 1976. С. 176–190.
16. Ивашедкина О.А. Методика проектно-исследовательской деятельности при изучении курса «Естествознание» // Методические ориентиры преподавания интегрированного курса «Естествознание»: монография/ науч. ред. И.Ю. Алексашина. Санкт-Петербург: СПб АППО, 2014. С. 86.
17. Каган М.С. Человеческая деятельность (Опыт системного анализа). Москва: Политиздат, 1974. 328 с.
18. Килпатрик В. Х. Метод проектов. Применение целевой установки в педагогическом процессе / В. Х. Килпатрик; пер. с 7-го англ. изд. Е. Н. Янжул; с предисл. Н. В. Чехова. Ленинград: Брокгауз–Ефрон, 1925. 43 с.
19. Колешко О.И. Азотфиксирующие бактерии (физиология развития). Минск: Издательство БГУ. 1981. 111 с.
20. Кудрявцева К.Э. Проектная деятельность как метод обучения // Научно-практические исследования. Москва: 2020. – № 1-3 (24). С. 181-185.
21. Левчук С.В., Дорожкина О.А. Проектная деятельность: анализ теоретических подходов в контексте психолого-педагогических исследований // Вестник Тамбовского университета. Серия: Гуманитарные науки. Тамбов, 2019. Т. 24, № 183. С. 7-13.
22. Леонтьев А.Н. Избранные психологические произведения: в 2 т. Москва: Педагогика, 1983, 320 с.
23. Линьков, А. В., Иванов, В. В. Азотфиксирующие бактерии в почве и симбиозе с растениями // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2017. № 5. С. 38-43.
18. Методы микробиологических исследований в экологии:

- учебное пособие / под ред. Н. Н. Романова и О. В. Поповой. Москва: Логос, 2017. 355 с.
24. Ломов Б.Ф. Методологические и теоретические проблемы психологии. Москва: Наука, 1984. С. 190-231.
 25. Мардахаев Л.В. Социальная педагогика. Москва: Изд-во Юрайт, 2017. 817 с
 26. Марченко А.А. Метод проектов как стимулирование познавательной деятельности обучающихся // Педагогика и психология образования. 2018. № 4. С. 59–65.
 27. Мирзоев, Т. Т., Баранов, В. С. Экологическая роль азотфиксирующих бактерий в агроэкосистемах // Вестник Аграрной науки. 2016. № 5. С. 39- 46.
 28. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. Москва: Наука. 1968. 306 с.
 29. Охотник за микробами. Методические рекомендации и инструкции по применению набора. [Электронный ресурс] Новосибирск, 2022, 16 с.
 30. Пентин А. Ю. Исследовательская и проектная деятельность: структура и цели. // Школьные технологии. 2007. № 5. С. 111-114.
 31. Рубинштейн С.Л. Основы общей психологии. Санкт-Петербург., 2000. 705 с.
 32. Селивановская, С. Ю. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов / С. Ю. Селивановская, В. З. Латыпова. Казань: Казан.ун–т, 2014. 38 с.
 33. Симонсен, Г. С., Рогова, М. А. Методы исследования микробиологических процессов в почвах. Микробиология, 2019. 188 с.
 34. Смирнов, И. Г., Соколов, В. С. Азотфиксирующие бактерии и устойчивость почвы к деградации // Вестник Аграрной науки, 2018. №3. С. 45-51.
 35. Смит, Дж. И. Микробиология почвы. Москва: Академкнига.2016. 253 с.

36. Трифонова Т.А., Сахно О.Н., Забелина О.Н., Феоктистова И.Д. Сравнительная оценка состояния городских почв по их биологической активности // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2014. № 3. С.23–27.
37. Федеральный государственный образовательный стандарт начального общего образования / Министерство образования и науки Российской Федерации. Москва: Просвещение, 2010. 31 с.
38. Франкл В. Человек в поисках смысла. Москва: Прогресс, 1990. 368 с.
39. Чеснокова, С.М. Оценка фитотоксичности антибиотиков и тяжелых металлов при комбинированном воздействии / С.М. Чеснокова, А.Г. Космачева, А.А. Друганов, Т.А. Трифонова // В сборнике: Экология речных бассейнов. Труды IX Международной научно-практической конференции. Владимир, 2018. С. 477–483.
40. Шлегель, Г. Г. История микробиологии / Г. Г. Шлегель; перевод с нем. Т.Г. Мирчинк. - изд. стер. - Москва: Эдиториал УРСС, 2014. 304 с
41. Яковлева Т.Г. Организационно-педагогическая модель организации внеклассной исследовательской деятельности учащихся // Академический вестник. Санкт-Петербург.: СПб АППО, Вып. 2. 2008. С. 68.
42. Bártíková H., Podlipná R., Skálová L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants // Chemosphere. V. 144. 2016. P. 2290–2301.
43. Kuppusamy S., Kakarl D., Venkateswarlu K., Megharaj M., Yoon Y.-E., Lee Y.B. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view // Agricult. Ecosyst. Environ. V. 257. 2018. P. 47– 59.,
44. Lee L.S., Carmosini N., Sassman S.A., Dion H.M., Sepúlveda M.S. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality // Adv. Agron. 2007. V. 93. P. 1–68. 94.
45. Prado N., Ochoa J., Amrane A. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system // Proc. Biochem. 2009. V. 44. P. 1302–1306