

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 44.03.05 Педагогическое образование
Профили подготовки Биология, Химия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К
АНТИБИОТИКАМ В НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ШКОЛЬНИКОВ»**

Студент

Тихонова Ирина Игоревна

Руководитель

Заплатин Б. П.

Нормоконтролер

Солдатов С. А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 11.06.20 № 12)

Заведующий кафедрой

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

отлично

(протокол заседания ГЭК от 30.06.20 № 13)

Секретарь ГЭК

Солдатов С. А.

Пенза, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Общая характеристика лактобактерий	6
1.2 Роль лактобактерий в медицине и питании человека	9
1.3 Характеристика и классификация антибиотиков	10
1.4 Чувствительность лактобактерий к антибиотикам	12
1.5 Использование молочнокислых бактерий в образовательном процессе....	14
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
2.1 Антибиотики.....	16
2.2 Пробиотики с лактобактериями.....	18
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	26
3.1 Характер роста молочнокислых бактерий на питательных средах	26
3.2 Резистентность лактобактерий к антибиотикам	32
ГЛАВА 4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ДЛЯ ШКОЛЬНИКОВ.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ	49

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В современной химиотерапии бактериальных инфекций ведущее место занимают антибиотики, их полусинтетические и синтетические аналоги и производные. Сегодня они доступны для каждого человека, в том числе и при самолечении. К побочным действиям антибиотиков относится дисбактериоз. Полезная для человека микрофлора, частично состоящая из разных штаммов кисломолочных бактерий, гибнет под действием антибиотиков, приводит к снижению количества лактобактерий в организме, что, в свою очередь, подавляет иммунитет [16].

Чтобы вернуть микрофлору кишечника в нормальное состояние, необходимо употреблять в пищу продукты, которые в своем составе содержат лактобактерии (кефир, йогурт и лекарственные препараты), однако, вопрос о способности данных микроорганизмов выживать при их одновременном приеме с антибактериальными препаратами остается открытым. Еще одним преимуществом продуктов-пробиотиков является то, что они не способны вызывать аллергическую реакцию.

В фармацевтике для производства препаратов чаще всего используют бактерии рода *Lactobacillus*. Например, такой вид, как *Lactobacillus rhamnosus*, успешно применяется для изготовления лекарств от диареи. Последние научные открытия позволяют говорить о том, что лактобактерии способны предотвратить появление онкологических заболеваний [28].

В настоящее время уделяется большое внимание изучению микроорганизмов – бактерий и вирусов, их влияние на организм человека. Учёные всего мира работают над созданием лекарств против многих инфекционных болезней [4].

Изучение бактерий на уровне школьной программы является поверхностным и этого недостаточно для полного понимания учениками о свойствах и организации микроорганизмов. Поэтому для расширения кругозора школьников и углубления знаний по данной теме, применения их в жизни даются задания для научно – исследовательских работ. Важно помочь ученикам реализовать свой творческий потенциал, стать создателем своей судьбы, нужным обществу и окружающим людям, а также понимать главные аспекты на пути сохранения и поддержания своего здоровья, объяснить школьникам основы знаний по биобезопасности и биозащите.

Целью организации научно – исследовательской работы учащихся является воспитание поколения мыслящего, жаждущего получать всё новые и новые знания, способствующие формированию образованной, гармонически развитой, творческой личности, способной добывать свои знания самостоятельно [4].

Забота о здоровье является основополагающим фактором для ведения человеком плодотворной деятельности. Насыщая свой организм необходимыми веществами, человек получает возможность улучшить, не только внутреннее, но и внешнее состояние своего организма [13].

Цель и задачи исследований. Цель нашей работы: предложить тему научно-исследовательской деятельности школьников связанную с изучением устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам диффузионным методом лунок.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Прорастить лактобактерии из лекарственных препаратов в чашках Петри, осуществив посев газоном;
2. Определить устойчивость лактобактерий к диффузионным методом лунок;

3. Сравнить полученные результаты опытов с литературными данными;

4. Разработать методику научно – исследовательской работы для школьников с использованием молочнокислых бактерий.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика лактобактерий

Еще совсем недавно никто и представить не мог, что молочнокислые палочки приносят огромную пользу человеческому организму, без них существование человека и животных было бы невозможным.

Лактобактерии можно встретить на всем протяжении пищеварительного тракта, где они участвуют в процессе переваривания пищи. Эти организмы не относятся к аэробам, поэтому способны хорошо выживать в условиях кишечника без доступа кислорода. Образую в кишечнике свои колонии, эти микроорганизмы предотвращают процессы брожения и гниения [17].

В отечественных трудах по технической микробиологии вместо родового названия лактобациллы (*Lactobacillus*) можно встретить термин лактобактерии (*Lactobacterium*), впервые использованный Н.А. Красильниковым для обозначения бактерий этой группы в «Определителе бактерий и актиномицетов» (1949 г.). Справедливости ради отметим, что поскольку бактерии этой группы спор не образуют, то правильнее называть их бактериями, а не бациллами, но Международным комитетом по номенклатуре бактерий в 1971 г. принято название *Lactobacillus* [15].

Полный перечень признаков группы МКБ включает: грамположительные, не образуют спор, аэро – и кислототолерантные, требовательные к источникам питания, образуют молочную кислоту в качестве основного конечного продукта углеводного метаболизма [7].

Внутри рода *Lactobacillus* встречаются бактерии с различной морфологией. Большинство представителей рода имеют форму прямых палочек с закругленными концами, собранных в цепочки различной длины, либо расположенные одиночно или попарно. Среди лактобацилл встречаются

короткие кокковидные и извитые формы, а также длинные, нитевидные палочки длиной от 0,7-1,1 до 3,0-8,0 мкм, расположенные единично или собранные в цепочки. Большинство лактобацилл неподвижны [15].

На плотных питательных средах лактобациллы формируют колонии сферические, гладкие, непрозрачные, иногда блестящие, выпуклые, с ровными четкими контурами. Обычно колонии мелкие, но у некоторых видов их размер может превышать 4 мм в диаметре. Колонии белые или слегка кремового цвета, иногда – желтоватые или красноватые.

Лактобациллы очень требовательны к источникам питания. Из углеводов они преимущественно сбраживают гексозы (глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу) и дисахариды (лактозу, мальтозу, сахарозу). Нуждаются для своего развития в различных факторах роста: аминокислотах, витаминах, нуклеотидах.

Большинство лактобацилл неподвижны. Подвижность наблюдается лишь у представителей некоторых видов, а также зависит от питательной среды и возраста культуры; часто она обнаруживается только при выделении лактобацилл и утрачивается после нескольких пересевов [2].

Почти все лактобациллы – мезофилы. Температурный оптимум развития лежит в пределах 30-40°C. Однако встречаются термофильные виды, которые хорошо растут и имеют активный метаболизм при температуре около 45°C [12].

Лактобактерии – факультативные анаэробы. Лактобациллы обычно слабо растут на воздухе, лучше – при пониженном содержании кислорода. Некоторые виды являются строгими анаэробами.

Физиологической особенностью лактобактерий является их кислотоустойчивость. Для роста лактобацилл наиболее благоприятны слегка подкисленные среды с начальным pH 5,5-6,5, причем рост культуры замедляется при достижении pH 3,6-4,0 в зависимости от вида и штамма. *L. suebicus*, *L. casei* и *L. plantarum* охраняют способность к росту даже при pH

2,8. В щелочных и нейтральных средах рост лактобацилл как правило замедляется [12].

Еще одна отличительная особенность – это спиртоустойчивость. Они способны развиваться в питательных субстратах при высоких концентрациях этилового спирта (18-24%).

Как правило, лактобактерии встречаются в условиях избытка углеводов, например, в пищевых продуктах (молочных продуктах, ферментированном мясе, хлебобулочных изделиях) и субстратах растительного происхождения. Кроме того, они занимают многие ниши внутри и на поверхности тела человека: в респираторном, желудочно-кишечном и урогенитальном тракте. Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах.

Лактобациллы присутствуют в ферментированных пищевых продуктах растительного происхождения (кислой капусте, соленых огурцах и др.) и напитках (пиве, вине, соках). Также содержатся в различных кисломолочных продуктах (сыре, йогурте, кефире и др.), куда их обычно добавляют специально при изготовлении пищевого продукта [3].

В двенадцатиперстной и толстой кишке лактобациллы вместе с энтерококками относятся к доминирующей микрофлоре [6]. Лактобациллы обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов и выполняют иммуномодулирующую функцию. В целом, большинство видов лактобацилл в кишечнике человека относится к транзиторной микрофлоре, следовательно, их состав и численность в значительной мере зависят от питания [2].

1.2 Роль лактобактерий в медицине и питании человека

В нашей стране особенно широко кисломолочные продукты стали применяться с начала XX века, когда И. И. Мечников впервые изучил

значение их в питании человека [20]. Он установил, что молочнокислые бактерии, попадая в кишечник, создают кислую среду, благодаря чему препятствуют развитию гнилостных бактерий, которые вызывают распад белков пищи до образования индола, скатола и других веществ, являющихся ядами. Как оказалось, кисломолочные продукты усваиваются организмом в разы быстрее и легче. Кроме того, регулярное употребление известных всем нам кефира, айрана, простокваши обеспечивает комфортную работу кишечника, нормализует деятельность печени и почек. Употребление кисломолочных продуктов показано при колитах, дисбактериозе, запорах и даже отравлениях [9].

Известно, что лечение антибиотиками убивает всю полезную микрофлору кишечника, поэтому польза простокваши, кефира, айрана и других подобных продуктов в этом случае неоспорима, так как благодаря кисломолочным бактериям негативное воздействие антибиотиков сводится к минимуму [8].

Большинство штаммов кисломолочных бактерий принимают участие в процессе переваривания довольно сложных по своей структуре соединений пищи растительного происхождения. Снижение риска развития онкологических заболеваний – польза для организма, которую несут лактокультуры, очевидна [27]. Они способны подавлять воздействие фенольных ферментов, оказывающих влияние на образование и дальнейшее размножение в кишечнике человека раковых клеток. Улучшение обмена веществ – молочная кислота, продуцируемая лактобактериями, улучшает усвоение железа, кальция, витамина D [13].

1.3 Характеристика и классификация антибиотиков

Со времени получения первых полусинтетических антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и т. д.) в последующие годы наблюдалось

интенсивное создание новых антибактериальных препаратов. Номенклатура антимикробных лекарственных средств в настоящее время превышает 200 наименований [24].

Антибиотики – вещества, избирательно угнетающие жизнедеятельность микроорганизмов. Под избирательным действием понимают активность только в отношении микроорганизмов при сохранении жизнеспособности клеток хозяина и действие не на все, а на определенные роды и виды микроорганизмов [26].

В основу классификации антибиотиков положено несколько разных принципов. По способу получения их делят на:

- а) природные;
- б) синтетические;
- в) полусинтетические (на начальном этапе получают естественным путем, затем синтез ведут искусственно) [14].

По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики:

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины).
2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, грамицидин и др.).
3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез РНК (новобиоцин, актиномицин и др.), ДНК (новобиоцин, актидион и др.).
4. Антибиотики, подавляющие синтез белка (тетрациклины, эритромицин, хлорамфеникол и др.).
5. Антибиотики – ингибиторы дыхания (антимисины и др.).
6. Антибиотики – ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины и др.).
7. Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами.

По спектру действия (числу видов микроорганизмов, на которые действуют антибиотики) они делятся на:

- а) препараты широкого спектра действия (макролиды);
- б) препараты узкого спектра действия (циclosерин, линкомицин, бензилпенициллин, клиндамицин)
- в) противогрибковые, действуют на болезнетворные грибки [14].

Заметим, что препараты узкого спектра в некоторых случаях могут быть предпочтительнее, так как не подавляют нормальную микрофлору.

По типу действия:

- а) бактерицидные, вызывающие гибель инфекционного агента (пенициллины, аминогликозиды);
- б) бактериостатические, действуют путем прекращения или приостановления размножения возбудителя (макролиды, тетрациклины, линкомицин) [12].

В основе антимикробного действия антибиотиков, как и других химиотерапевтических средств, лежит нарушение метаболизма микробных клеток [11].

По механизму антимикробного действия антибиотики можно разделить на несколько групп:

- ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):
 - Бета – лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).
 - Гликопептиды (ванкомицин, клиндамицин) [22].
- подавляющие белковый синтез – нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и заканчивая взаимодействием с рибосомами – блокирование связывания транспортной т-РНК. Эта группа антибиотиков – самая многочисленная, в нее входят: аминогликозиды, макролиды, тетрациклины [12].

- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот – эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства.

По спектру антимикробной активности:

- антибактериальные;
- противогрипковые;
- антипротозойные.

Продуцентами большинства антибиотиков являются: актиномицеты, плесневые грибы. Но их можно получить и из бактерий (полимиксины), высших растений (фитонциды), тканей животных и рыб (эритрин, эктерицид) [14, 15].

1.4 Чувствительность лактобактерий к антибиотикам

Медицинские исследования показали, что пробиотики являются чрезвычайно эффективными во время лечения антибиотиками [28].

В ходе микробиологического исследования, выполненного M.R. D'Aimmo (Италия), изучалась чувствительность бактерий – пробиотиков, входящих в состав ряда коммерческих молочных продуктов и лекарственных препаратов к антибиотикам.

Среди полученных штаммов лактобацилл выявлялись *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus bulgaricus*. Все протестированные в ходе исследования штаммы оказались чувствительными к пенициллину, рифампицину и резистентными к доксициклину и спектиномицину. Чувствительность изолятов к гентамицину, линкомицину, неомицину, тетрациклину и варьировала в зависимости от вида. Исследование показало, что целесообразность одновременного применения пробиотиков (в частности, лактобактерий) с большинством используемых антибиотиков сомнительна, поскольку пробиотические микроорганизмы чувствительны ко многим антимикробным препаратам [18].

В другой работе анализировались образцы антибиотиков «Гентамицин» и «Тетрациклин», а также лекарственный препарат «Линекс» в таблетках. Содержимое таблетки «Линекс» (препарат, содержащий три вида кисломолочных бактерий) высыпали в ампулу с водой для инъекций, затем осуществили посев на агарированную среду. Через 2 дня после инкубации в чашки Петри был внесен антибиотик диффузионным методом лунок и поставили в термостат на 2 дня при температуре + 37°C. Исследования образцов показали, что ни один антибиотик не изменил внешнее строение использовавшихся бактерий. Они сохранили шаровидную форму и размеры. Но, количество их на единице площади поверхности образца после воздействия антибиотика гораздо меньше. Следовательно, под воздействием антибиотика изменилась скорость размножения молочнокислых бактерий [11].

В исследовании на тему «Резистентность пробиотических штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам» целью работы являлось изучение чувствительности выделенных из природных источников (кислого коровьего молока, ржаной муки) штаммов и промышленных культур молочнокислых бактерий к ряду антибиотиков широкого спектра действия. Объектами исследования служили культуры молочнокислых бактерий: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilum*, *L. fermentum* и *L. bavaricus*. Чувствительность к антибиотикам изучали диско – диффузным методом. Чашки с дисками инкубировали в течение 24 ч. В анаэробных условиях при температуре +37°C. Оценка результатов проводилась по диаметру зон задержки роста микроорганизмов. В исследовании использованы следующие антибиотики: бензилпенициллин, линкомицин, канамицин, неомицин, доксициклин, ристомидин. В основном это антибиотики широкого спектра действия, активные как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Анализ полученных результатов привел к выводу, что в целом все изученные культуры обладали либо устойчивостью, либо малой чувствительностью к большинству антибиотиков. Особую устойчивость к проверенным антибиотикам проявляют три штамма молочнокислых бактерий – *L.casei*, *L. fermentum*, *L. bavaricu*, что подтверждает их лечебно-профилактические свойства и делает перспективным их использование для создания новых продуктов питания с функциональными свойствами [10].

1.5 Использование молочнокислых бактерий в образовательном процессе

Данные о полезных свойствах штаммов лактобактерий могут быть использованы в научно – исследовательской работе школьников, проведении лабораторных работ, а также в работах над проектами по микробиологии связанными с основами здорового и рационального питания [4].

Лабораторные занятия играют важную роль в изучении биологии. Эти занятия помогают закрепить полученные теоретические знания, овладеть основными навыками биологических исследований, приучают их грамотно работать с учебной литературой.

Методические указания к каждой практической работе, в которых изложены теоретические основы лабораторного занятия, а также контрольные вопросы для проверки теоретической подготовленности школьников к занятию исключают возможность автоматического, неосмысленного выполнения работы. Это возможность привлечь интерес учащихся к предмету, участвовать в проектной деятельности.

Темы проектов для учащихся по микробиологии:

1. Биохимическая активность бактерий.
2. Микробы – «друзья» или «враги»?
3. Полезные свойства пробиотиков.

4. Молочнокислые бактерии на службе человека.
5. Роль лактобактерий в повышении иммунитета человека.
6. Устойчивость лактобактерий к антибиотикам.

Научно – исследовательская деятельность направлена на решение творческой задачи с заранее не известными результатами и состоит из этапов, присущих научному исследованию: определение проблемы исследования, выбор темы, постановка цели и задач, изучение теории, выбор и освоение методики, сбор материала, обработка и анализ полученных данных, подготовка отчета и обсуждение результата. В ходе учебного исследования организуется научный поиск.

При обучении биологии исследовательская деятельность направлена на расширение предметных знаний, позволяет выявлять и развивать интеллектуальные и потенциальные творческие способности школьников. Проведение биологических учебных исследований стимулирует мыслительный процесс, направленный на поиск и решение проблемы, требует привлечения знаний из разных областей [4].

Научная значимость исследований заключается в расширении аппарата для решения заданий ЕГЭ, развитии кругозора. Практическая значимость исследования состоит в том, что его материалы могут быть использованы в образовательной деятельности по биологии, для проведения занятий в кружке, факультативных занятий.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Антибиотики

Основой для выбора антибиотиков, подлежащих включению в исследование, являются данные о клинической эффективности антибиотиков и частоты их использования в научных работах. В качестве объектов исследования в нашей работе были использованы следующие антибактериальные препараты: «Гентамицин», «Бензилпенициллин», «Линкомицин».

«Гентамицин».

Лекарственная форма: раствор для инъекций 4 %, 2 мл.

Состав: 2 мл раствора содержат активное вещество - гентамицина сульфат (в пересчете на гентамицин) – 80,0 мг, вспомогательные вещества: натрия метабисульфит, динатрия эдетат, вода для инъекций.

Фармакотерапевтическая группа: антибактериальные препараты для системного использования. Аминогликозидные антибактериальные препараты. [26].

Фармакодинамика: гентамицина сульфат – антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, антибактериальное средство для местного и парентерального применения. Активно проникая через клеточную мембрану бактерий, необратимо связывается с 30S субъединицей бактериальных рибосом и тем самым угнетает синтез белка возбудителя. Гентамицин оказывает бактерицидное действие в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе так называемых «устойчивых микробов», резистентных к другим антибиотикам.

Активен в отношении широкого ряда патогенных бактерий, в том числе *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* (включая штаммы, устойчивые к пенициллину и метициллину) [18].

К гентамицину устойчивы *Neisseria meningitides*, *Treponema pallidum*, некоторые штаммы *Streptococcus spp.*, анаэробные бактерии.

Не действует на грибы, вирусы, простейшие.

Производитель: РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь
«Бензилпенициллин».

Лекарственная форма: порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения 1000000 ЕД.

Состав: один флакон содержит активное вещество – бензилпенициллин натрия (в пересчете на активное вещество) - 0,6 г (1000000 ЕД).

Фармакотерапевтическая группа: бета – лактамные антибактериальные препараты - пенициллины. Пенициллины пенициллиназа – чувствительные. Бензилпенициллин [26].

Фармакодинамика: бактерицидный антибиотик из группы биосинтетических природных пенициллинов. Ингибирует синтез клеточной стенки микроорганизмов.

Антибиотик активен в отношении грамположительных возбудителей: *Staphylococcus spp.* (необразующие пенициллиназу), *Streptococcus spp.* (в т.ч. *Streptococcus pneumoniae*), *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Actinomyces spp.*; грамотрицательных микроорганизмов: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, а также в отношении *Treponema spp.*. Неактивен в отношении большинства грамотрицательных бактерий, риккетсий, вирусов, простейших.

К действию препарата устойчивы пенициллиназообразующие штаммы микроорганизмов. Разрушается в кислой среде.

Производитель: ОАО «Биосинтез», Российская Федерация [18].

«Линкомицин».

Лекарственная форма: раствор для инъекций.

Состав: линкомицин 300 г; вспомогательные вещества: динатрия эдетат, раствор натрия гидроксида, вода.

Фармакотерапевтическая группа: антибактериальные препараты-линкозамиды. Линкомицин [21, 26].

Фармакодинамика:

антибиотик группы линкозамидов. В терапевтических дозах действует бактериостатически. При более высоких концентрациях оказывает бактерицидное действие. Подавляет синтез белка в микробной клетке. Активен преимущественно в отношении аэробных грамположительных бактерий: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, анаэробных бактерий *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* Линкомицин активен также в отношении *Mycoplasma spp.* К линкомицину устойчивы большинство грамотрицательных бактерий, грибы, вирусы, простейшие. Устойчивость вырабатывается медленно.

Производитель: «Дальхимфарм» ОАО, Российская Федерация, Хабаровский край, г. Хабаровск [18].

2.2 Пробиотики с лактобактериями

В качестве объектов исследования были использованы две биологически активные добавки «Наринэ», «Лактобактерин» и кисломолочный продукт «Актимель», содержащие в себе чистые культуры *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L.casei* соответственно.

«Наринэ».

Состав: один пакетик (200 мг) содержит лиофилизат молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* штамм п.в. Ер 317/402 их количество 1×10^9 КОЕ/г.

Lactobacillus acidophilus штамм п.в. Ер 317/402, выделенный армянским ученым Л.А. Ерзинкяном в 1964 году. Многолетние исследования

показали, что штамм является пробиотической культурой и по культуральным, морфо – физиологическим свойствам строго отличается от других культур ацидофильных бактерий [28].

Как описывает производитель «Наринэ» обладает высокой приживаемостью в желудочно – кишечном тракте, витаминообразующей способностью, характеризуется устойчивостью к антибиотическим, химиотерапевтическим и антисептическим веществам, может использоваться как отдельно, так и в комплексе с указанными препаратами, в укороченные сроки улучшает состав анаэробной флоры, повышает активность нормальной кишечной палочки.

В 80-х годах XX века японские ученые установили, что «Наринэ» увеличивает выработку интерферона, тем самым повышая защитные силы организма. «Наринэ» эффективна в комплексной терапии, при:

- дисбактериозах, желудочно – кишечных заболеваниях (дизентерия, сальмонеллез, стафилококковая инфекция);
- нарушении равновесия кишечной микрофлоры (диарея, запоры, метеоризмы);
- применении антибиотических, химиотерапевтических, гормональных препаратах и облучении;
- ожирении и заболевании парадонта. «Наринэ» обладает иммуномодулирующими свойствами, способствует усилению действия диеты, направленной на снижение уровня холестерина в сыворотке крови [29, 19].

Производитель: НАРЭКС, ООО Армения.

Следующим образцом, содержащим лактобактерии был фармакологический препарат «Лактобактерин» сухой.

Состав: лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь и местного применения. Микробная масса живых, антагонистически активных лактобактерий штаммов *Lactobacillus rhamnosus* (в 100 г. продукта) не менее

2x10⁹ КОЕ/г, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной сахаро-желатиновой или сахаро-желатино-молочной среды.

Фармакодинамика: живые лактобактерии грамположительные, палочковидные, микроаэрофильные и факультативно анаэробные бактерии. Могут расти индивидуально или в короткие цепочки. Не образуют спор, не подвижны. Мезофильны, но некоторые штаммы могут расти при температуре ниже 15°C или выше 40°C, входящий в препарат штамм, обладает антагонистической активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий (включая стафилококки, протей, энтеропатогенную кишечную палочку), нормализует пищеварительную деятельность ЖКТ, улучшает обменные процессы, способствует восстановлению естественного иммунитета. Молочная кислота в высокой концентрации создает неблагоприятные условия для жизнедеятельности кислоточувствительных патогенных и условно-патогенных бактерий [5, 17].

Производитель: «МИКРОГЕН» НПО АО, Россия.

Третий образец, фармакологический препарат «Биоамикус».

Состав: подсолнечное масло, культура лактобактерий *Lactobacillus reuteri*, кремния диоксид. Штамм *Lactobacillus reuteri* является природным, генетически не модифицирован. Не содержит красителей, консервантов, искусственных вкусовых добавок, лактозы, глютена, сои, молочного белка, морепродуктов, яичного белка, любых компонентов ГМО. 5 капель (0,2 мл) содержат 200 млн. КОЕ лактобактерий *Lactobacillus reuteri*.

Фармакодинамика: в качестве биологически активной добавки к пище для детей с рождения и других возрастных категорий – источника пробиотических микроорганизмов (лактобактерий). *Lactobacillus reuteri* является одной из самых наиболее хорошо изученных пробиотических лактобактерий в мире [21].

Проведено более 150 клинических исследований с этими бактериями, где доказана их эффективность и безопасность. Это единственный вид *Lactobacillus*, который синтезирует противомикробное вещество реутерин, обладающий широким спектром активности в отношении патогенных бактерий, в том числе клостридий, грибов и простейших [21].

Именно этот вид содержится в пробиотике нового поколения – БиоАмикус лактобактерии в каплях.

Производитель: BIOAMICUS LABORATORIES INC., Канада.

Следующий образец, содержащий лактобактерии «Актимель» – это пробиотический кисломолочный продукт.

Состав: обезжиренное молоко, сухое обезжиренное молоко, сахарный сироп, глюкоза, закваска для йогурта, *L.casei* не менее 1×10^7 КОЕ/г., витамины В6 и Д3.

L.casei также способны синтезировать молочную кислоту из лактозы, благодаря чему улучшается процесс переваривания и усваивания полезных веществ из пищи, поддерживает определенную кислотность, не позволяет размножаться патогенным микроорганизмам [22].

Изготовитель: ООО «Данон Индустрия», РФ Московская область, Чеховский район, п. Любучаны.

Методы исследований: для того чтобы провести оценку и выяснить как молочнокислые бактерии быстро и активно растут на питательных средах нам необходимо осуществить подбор агарированных сред. Затем для того чтобы определить чувствительность лактобактерий к антибиотикам пользовались диффузионным методом лунок. Этот метод используется для определения чувствительности, основанной на способности антибактериальных препаратов диффундировать из пропитанных ими дисков, в питательную среду, при этом угнетая рост микроорганизмов, посеянных на эту среду.

Для изготовления фиксированных препаратов выросших образцов лактобактерий использовали окрашивание метиленовой синькой: чистое предметное стекло смачивали насыщенным водным раствором метиленового синего. Когда краска на стекле высохла, его протирали сухой тряпочкой до нежно-голубой окраски. На подготовленное таким образом стекло наносили каплю исследуемой культуры, накрывали покровным стеклом и микроскопировали.

В ходе лабораторных опытов проводились наблюдения за ростом и активностью лактобактерий в оптимальных для них условиях и в течение влияния антибиотиков, подсаженных в чашки Петри к молочнокислым образцам. Фиксировали зону резистентности и чувствительности лактобактерий к антибиотикам.

Посев культур молочнокислых бактерий на различные питательные среды без влияния антибиотиков.

Сущность метода: питательные среды имеют различный состав, а значит, обеспечивают различные условия для роста микроорганизмов.

Приготовление сред:

Гидролизованное молоко (по Богданову).

1) натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятили или обрабатывали текущим паром в течение 20 мин;

2) охлаждали до температуры $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;

3) устанавливали активную кислотность pH (7,6-7,8);

4) к 300 см³ молока добавляли (0,3) г порошка панкреатина и 1,5 см³ хлороформа;

5) колбу со смесью закрывали корковой пробкой и выдерживали в термостате при температуре 40°C в течение (18-24) ч.

6) в течение первых (3-5) ч молоко несколько раз перемешивали (пробку после встряхивания приоткрывали для удаления паров хлороформа).

7) через (18-24) ч колбу вынимали из термостата, гидролизованное молоко фильтровали через бумажный фильтр (Приложение 13), разводили дистиллированной водой в соотношении 1:1, устанавливали активную кислотность рН (5,5-6,5);

8) стерилизовали при температуре $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Гидролизованное молоко допускается хранить при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 30 дней.

Подкисленная среда MRS.

Состав:

- пептон - 5 г;
- мясной экстракт - 5 г;
- дрожжевой экстракт - 2,5 г;
- глюкоза - 10 г;
- твин 80 - 0,5 см³;
- фосфат калия однозамещенный - 1 г;
- ацетат натрия тригидрат - 2,5 г;
- диаммоний цитрат - 1 г;
- сернокислый магний - 0,1 г;
- сернокислый марганец - 0,025 г;
- агар - 7,5 г;
- дистиллированная вода - 500 см³.

Все компоненты (кроме твин 80) вносили в колбу, перемешивали, нагревали до полного растворения. Добавляли 0,5 см³ твин 80. Охлаждали до температуры $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и устанавливали рН таким образом, чтобы после стерилизации рН составил $(5,4 \pm 0,2)$ при температуре $25 ^\circ\text{C}$. Готовую среду разливали в пробирки или колбы и стерилизовали при температуре $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (15 ± 1) мин.

Подготовка образцов для исследования: содержимое пакета «Наринэ» (250 мг) и сухую суспензию одного флакона «Лактобактерина» массой 1 г высыпали в стерильные стаканы, в каждый из них заливали 5 мл теплой дистиллированной воды, оставляли на некоторое время (1-2 часа). Кисломолочный продукт «Актимель» и фармакологический препарат «Биоамикус» также наливали в стерильный стакан и использовали для посева сразу (Приложение, рисунок 1).

Посев: открывали стерильную чашку Петри со средой гидролизованное молоко (по Богданову), вводили шпатель Дригальского из алюминиевого сплава с посевным материалом, слегка касаясь шпателем поверхности среды и аккуратно размазывая внесенный материал по всей площади питательной среды в чашке. Все манипуляции проделывали рядом с горящей спиртовкой.

То же самое проделывали с подкисленной средой MRS.

Чашки Петри с посевом ставили в термостат при 37°C на 48 часов.

После истечения времени вынимали чашки и оценивали характер роста культуры на данных средах.

После выбора наиболее благоприятной питательной среды для данных лактобактерий осуществили новый посев. По истечению 48 часов в термостате на ровный газон бактерий посадили наши образцы антибиотиков.

Сущность метода: различные виды молочнокислых бактерий по-разному реагируют на соприсутствие антибиотиков.

Подготовка образцов для исследования: в 3 стерильные пробирки наливали по 2 мл антибиотика «Линкомицин». Маркировали пробирки 1,2,3 и разбавляем антибиотик дистиллированной водой 1:1, 1:2 и 1:3 соответственно. Хорошо перемешивали содержимое пробирок.

Посев: осуществляли диффузионным методом лунок. Приготовленные разведения антибиотика вносили в предварительно сделанные в толще агара лунки диаметром 8-9 мм. Растворы испытуемого образца вносили в лунки пипеткой в объеме 0,1 мл, в одну лунку один заданный раствор. Для каждого испытания использовали не менее 3-х чашек. Чувствительность определяли по наличию и размеру зоны замедления роста. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов, затем измеряли диаметры зон задержки роста тест-микроба, образуемыми растворами.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характер роста молочнокислых бактерий на различных питательных средах

Для того чтобы убедиться насколько эти лактобактерии устойчивы к воздействию на них антибиотиков в нашей работе были использованы фармакологический препарат «Лактобактерин», БАД «Наринэ», БАД «Биоамикус».



Рисунок 1. Фармакологический препарат «Лактобактерин»



Рисунок 2. БАД «Наринэ»



Рисунок 3. Фармакологический препарат «Биоамикус»



Рисунок 4. Кисломолочный продукт «Актимель»

Нами был совершен посев газомом штаммов лактобактерий из фармакологического препарата “Лактобактерин”, БАД «Наринэ», «Биоамикус» и кисломолочного продукта «Актимель» (Приложение, рисунок 5), в состав которых входят: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *L.casei* соответственно, на питательные среды: Гидролизованное молоко (по Богданову) и подкисленную среду MRS. Все опыты проводили в боксе. После 48 часового инкубирования мы получили следующие результаты:

Таблица 1 – Наличие роста колоний на средах.

Питательные среды	Лактобактерии			
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L.casei</i>
Гидролизованное молоко (по Богданову)	-	+	-	-
Подкисленная среда MRS	+	+	-	+
Примечание: наличие роста: + нет роста: -				

Характер роста колоний на средах:

– Гидролизованное молоко (по Богданову).

L. rhamnosus: рост лактобактерий не наблюдается;

L. acidophilus: наблюдаются единичные некрупные беловатые колонии, диаметром не более 2 мм;

L. reuteri: роста колоний не наблюдается;

L. casei: наличия колоний лактобактерий не обнаружено.

– Подкисленная среда MRS.

L. rhamnosus: культуральный газон на питательной среде ровный, заметны помутнения на агаре;

L. acidophilus: наблюдаются многочисленные колонии белого цвета в виде кругов и тяжей;

L. reuteri: роста колоний не наблюдалось;

L. casei: наблюдается ровный газон по всей площади питательной среды.

Далее исследовали морфологические признаки лактобактерий путём микроскопирования. Сделали мазки со среды (подкисленная среда MRS) каждой из культур на покровное стекло, совершив окрашивание метиленовой синькой, на фото видны окрашенные лактобактерии:

L. rhamnosus палочковидные бактерии, не образуют спор, растут индивидуально или в небольшие цепочки;

L. acidophilus не образуют спор, обычно изолированы или образуют небольшие скопления;

L. casei неподвижные бациллы, не образуют спор. Они меньше, чем *L. acidophilus*, заметна большая изменчивость по форме, размеру, иногда лактобактерии способны к образованию цепочек.

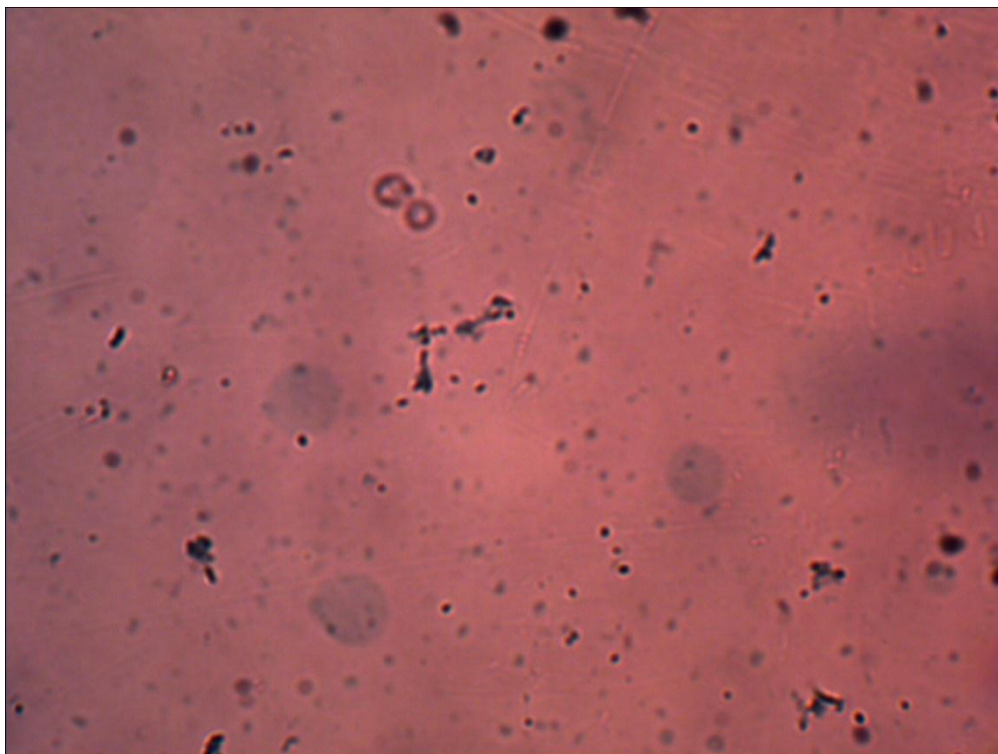


*Рисунок 5. Препарат (молочнокислые бактерии *L.rhamnosus* «Лактобактерин»), подкисленная среда MRS, окрашивание метиленовой синькой*

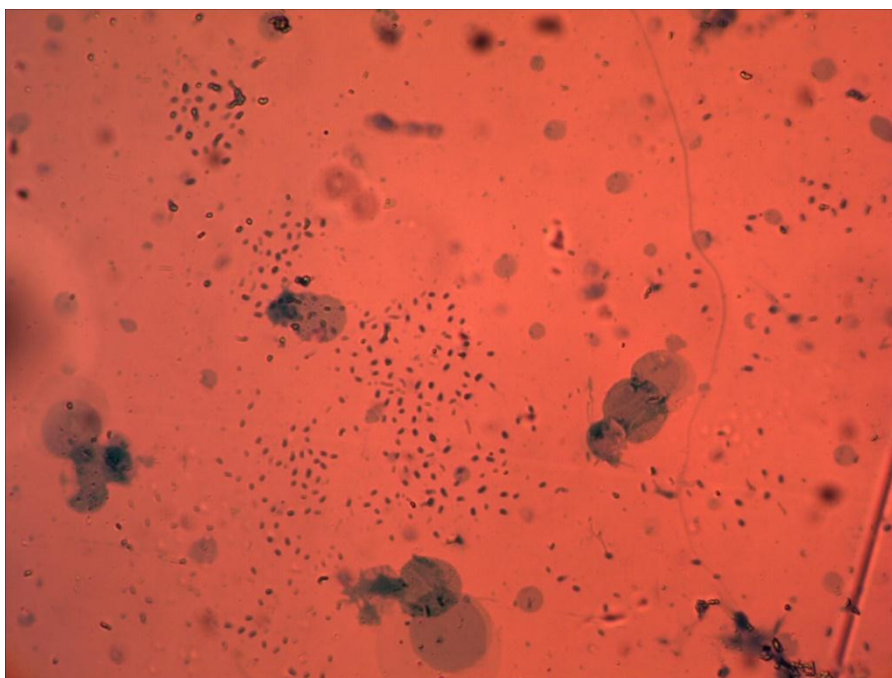


*Рисунок 6. Препарат (молочнокислые бактерии *L. acidophilus* «Наринэ»), подкисленная среда MRS, окрашивание метиленовой синькой*

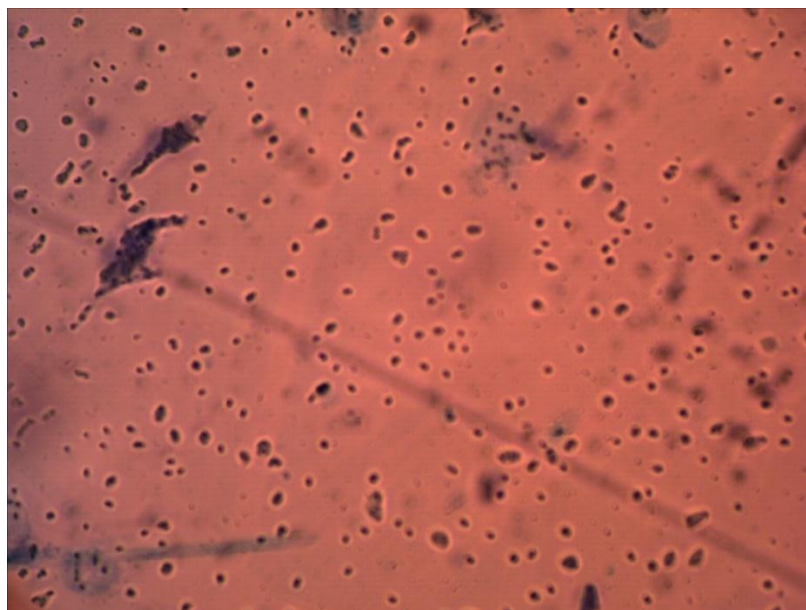


*Рисунок 7. Препарат (молочнокислые бактерии *L.casei* «Актимель»), подкисленная среда MRS, окрашивание метиленовой синькой*

Затем также взяли мазок *L. acidophilus* с питательной среды гидролизованное молоко (по Богданову), на которой выросли данные лактобактерии. Произвели окрашивание метиленовой синькой и пронаблюдали морфологию, а также количество бактерий под микроскопом. На снимке можно увидеть, что численность *L. acidophilus* невелика, спор также не образовано и в основе составляют выросшие одиночные бактерии.

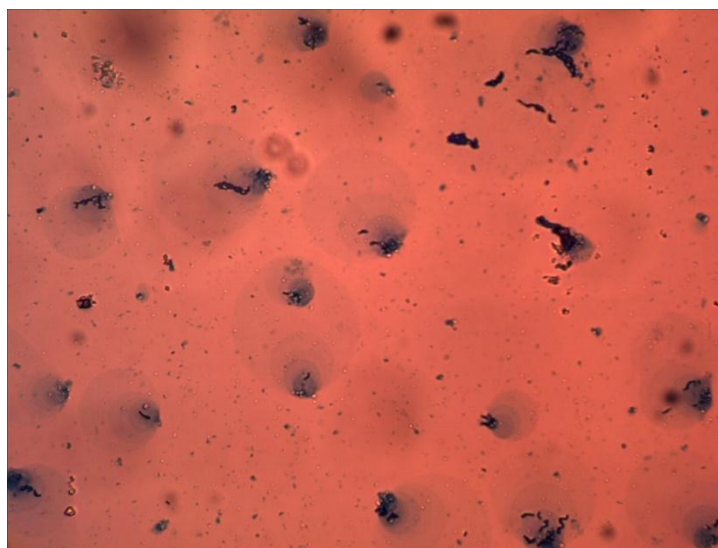


*Рисунок 8. Препарат (молочнокислые бактерии *L. acidophilus* «Наринэ»), гидролизованное молоко (по Богданову), окрашивание метиленовой синькой*

В ходе экспериментов и наблюдений за активностью прорастания и количеством лактобактерий была выбрана оптимальная питательная среда (подкисленная среда MRS) для всех трех видов лактобактерий, а именно: *L. rhamnosus*, *L. Acidophilus*, *L.casei*, т.к. рост бактерий был наиболее высоким, по сравнению со средой (гидролизованное молоко (по Богданову)).

Фармакологический препарат «Биоамикус», содержащий штамм лактобактерий *L. reuteri* в дальнейшей работе использован не был, т.к. роста на обеих питательных средах не наблюдался, возможно, из-за содержания в препарате подсолнечного масла, которое ингибирует все биохимические процессы бактерий для их роста и развития на питательных средах.

3.2 Резистентность лактобактерий к антибиотикам

Нами проверялась устойчивость лактобактерий *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L.casei*, ко всем антибиотическим препаратам, которые были выбраны для исследования: «Линкомицин», «Гентамицин», «Бензилпенициллин». Использовался диффузионный метод лунок.

Каждая чашка Петри с исследуемыми образцами 3 видов лактобактерий была поделена на шесть сегментов. Приготовили ряд разведений антибиотиков «Линкомицин» и «Гентамицин» с дистиллированной водой в 6 пробирок в соотношении: 1:1, 1:2 и 1:3. Предварительно сделали 6 лунок в каждой чашке Петри на питательной среде стерильным металлическим цилиндром, диаметром 8,5 мм. Растворы испытуемого образца вносили в лунки, пипеткой в объеме 0,1 мл, в одну лунку один заданный раствор. Для каждого испытания использовали не менее 3-х чашек (Приложение, рисунки 6, 7, 8, 12). Таким образом, было проведено шесть повторностей для каждого образца лактобактерий. Затем все чашки Петри в закрытом виде поместили в термостат продолжительностью от 24 до 30 ч. при температуре 37-38 °С.

Чувствительность лактобактерий к антибиотику определяли по наличию и размеру зоны замедления роста. Отсутствие роста тест – микроорганизма на расстоянии более 10 мм от диска с антибиотиком указывает на чувствительность штамма. Если же тест – микроорганизм развивается в непосредственной близости от диска, пропитанного антибиотиком, то это означает, что данный микроорганизм устойчив к действию антибиотика. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм. Были получены следующие результаты:

Таблица 2 – Устойчивость молочнокислых бактерий рода *Lactobacterium* к антибиотикам.

Антибиотики		Зона ингибирования роста, мм		
		<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L.casei</i>
Линкомицин	1:1	4	0	0
	1:2	3	0	0
	1:3	1	0	0
Гентамицин	1:1	4	0	1
	1:2	2	0	1
	1:3	0	0	0

Следует отметить, что микроорганизмы штамма *L. rhamnosus* по сравнению со штаммами *L. acidophilus* и *L.casei* замедляют рост и развитие вокруг дисков антибиотиков, внесенных в питательную среду (Приложение, рисунки 9, 10, 11).

Как и в первом эксперименте, мы исследовали морфологические признаки лактобактерий путём микроскопирования. Подобным образом сделали мазки со среды (подкисленная среда MRS) каждой из культур на

покровное стекло, совершив окрашивание метиленовой синькой, на фото видны окрашенные лактобактерии:

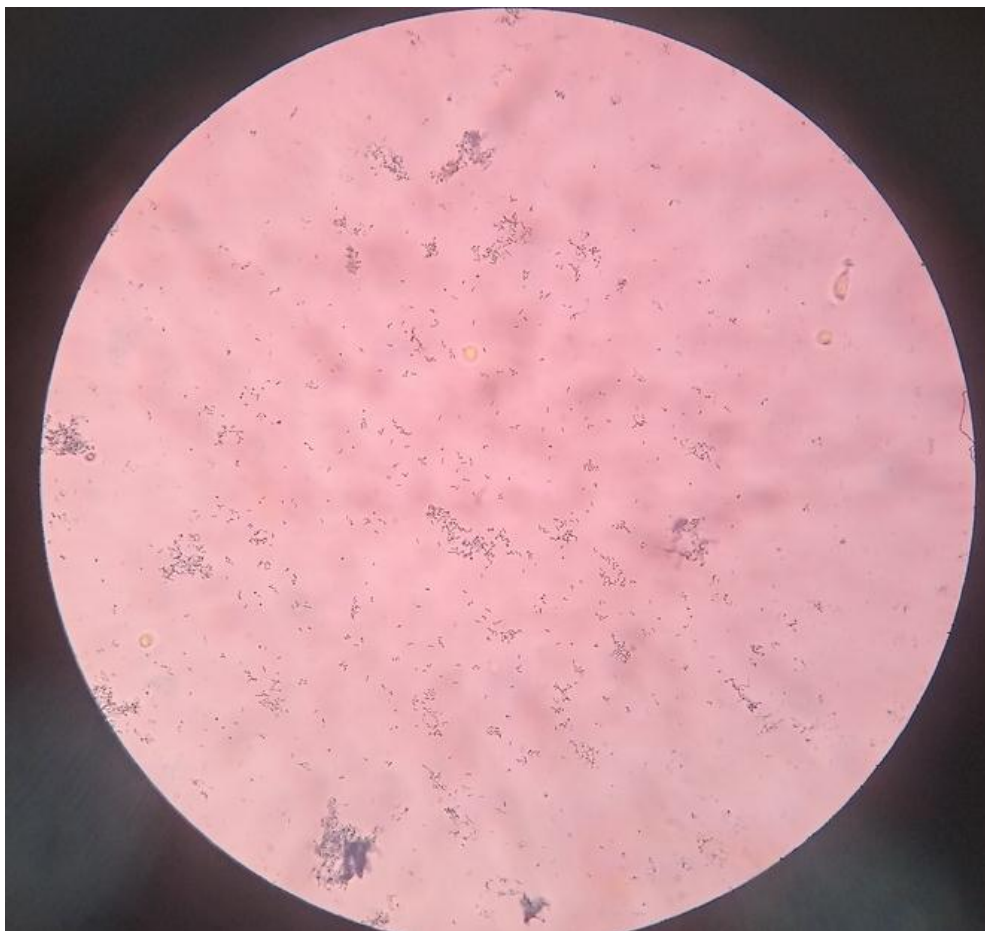


Рисунок 9. Бактерии L. rhamnosus, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS, наличие антибиотика «Линкомицин»

На снимке можно увидеть, что молочнокислые бактерии *L. rhamnosus*, составляющие основу препарата «Лактобактерин», не изменили свои морфологические свойства, имеют палочковидную форму, растут индивидуально или скапливаются в небольшие цепочки, несмотря на то, что оказывалось воздействие антибиотиком «Линкомицин». Данный антибиотик в свою очередь действует бактериостатически. Подобную ситуацию также возможно пронаблюдать у двух других видов лактобактерий при влиянии этого антибиотика на образцы *L. acidophilus* и *L.casei*.

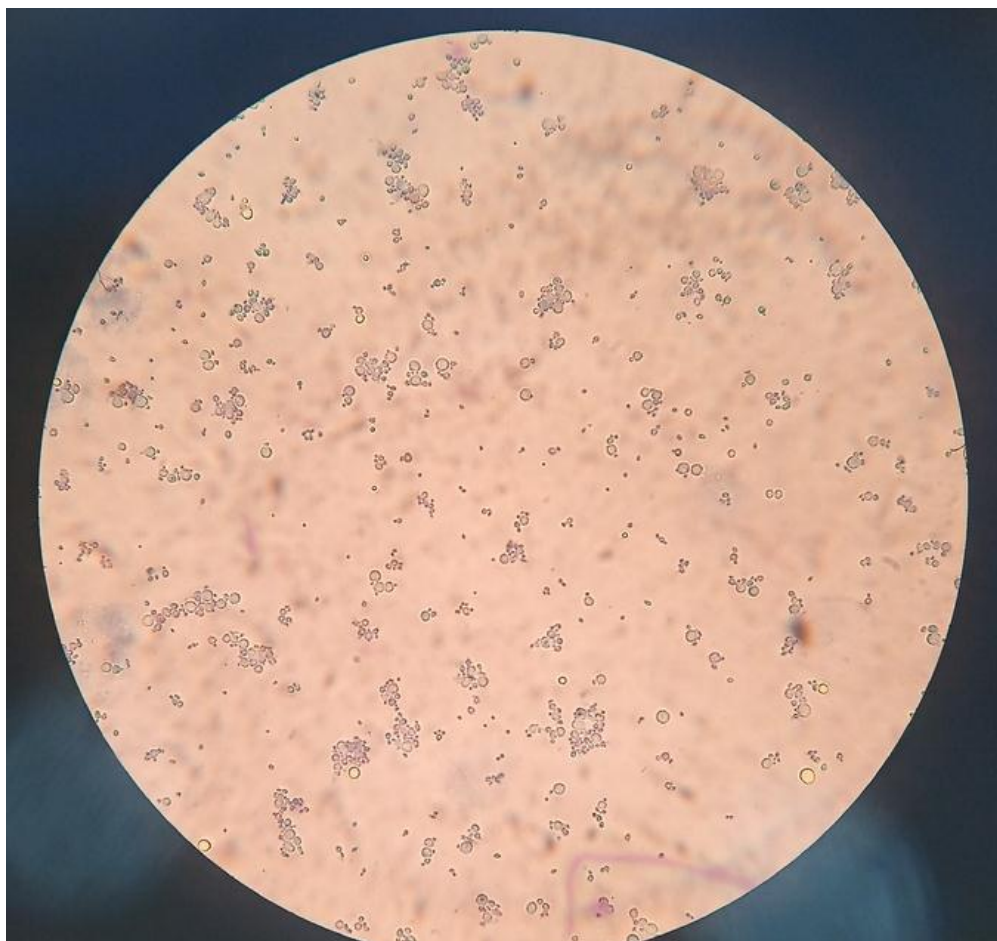


*Рисунок 10. Бактерии *L.acidophilus*, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS, наличие антибиотика «Линкомицин»*

Молочнокислые бактерии *L. acidophilus*, входящие в состав биологически активной добавки «Наринэ» не отличаются по морфологии от выращенных образцов бактерий, выращенных без влияния на них антибиотика «Линкомицин». Они также, располагаются поодиночке или небольшими скоплениями, имеют вид палочек с закругленными концами.

Третьим образцом на определение устойчивости лактобактерий к антибиотикам был молочнокислый продукт «Актимель», содержащий *L.casei*. По результатам эксперимента данные бактерии не оказались чувствительными к «Линкомицину». Мы провели микроскопирование фиксированного препарата с образцом *L.casei* и убедились в том, что внешние характеристики также не изменились.

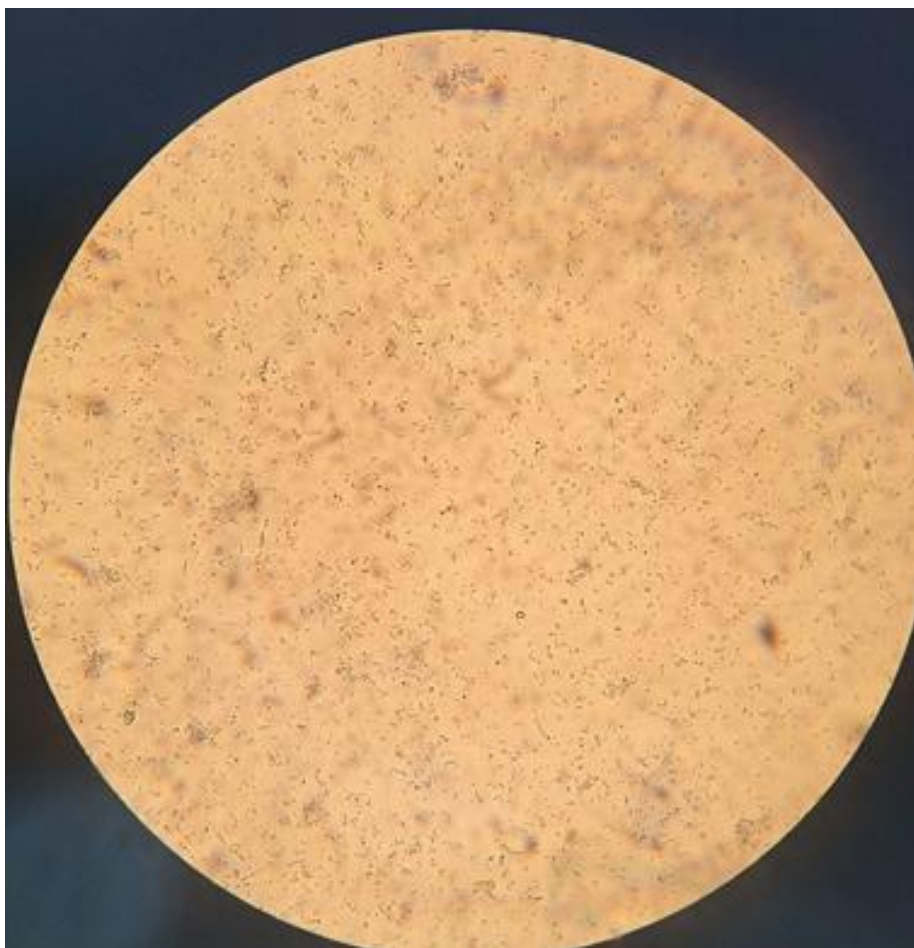


Рисунок 11. Бактерии L.casei, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS наличие антибиотика «Линкомицин»

Молочнокислые бактерии представляют собой неподвижные бациллы, не образуют спор. Они меньше, чем *L. acidophilus*, заметна небольшая изменчивость между собой по форме, размеру, образуют короткие цепочки.

В дальнейшей работе мы провели опыт на устойчивость лактобактерий к антибиотикам, с использованием прежних трех образцов молочнокислых бактерий, питательной среды MRS и антибиотика «Гентамицин».

Нами были проведены посев культур лактобактерий на питательные среды, внесение антибиотика диффузионным методом лунок. Далее все чашки Петри в закрытом виде поместили в термостат продолжительностью от 24 до 30 ч. при температуре 37-38 °С. По истечению времени инкубации мы осуществили наблюдение за равномерностью культурального газона лактобактерий на питательной среде, измерили зону ингибирования роста

молочнокислых бактерий, результаты приведены в таблице 2. Как и в предыдущих экспериментах взяли мазки культур с питательных сред, сделали окрашивание метиленовой синькой и совершили микроскопирование фиксированных препаратов.

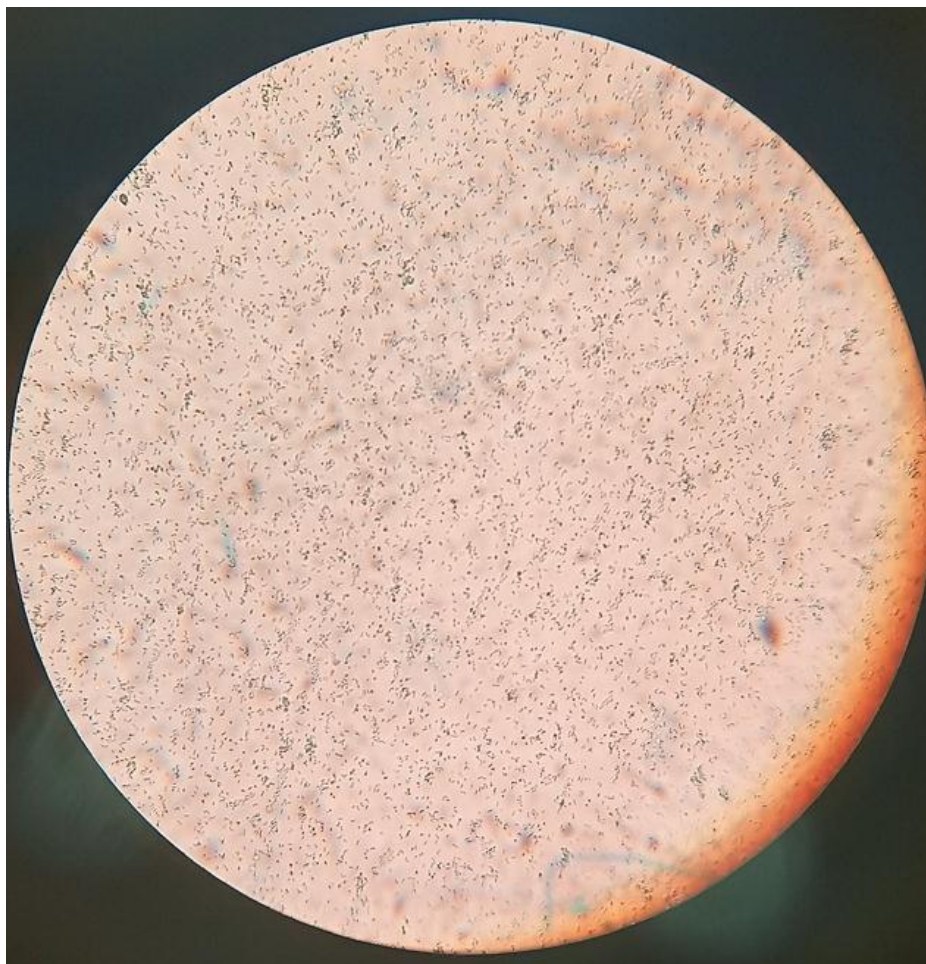


Рисунок 12. Бактерии L.rhamnosus, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS наличие антибиотика «Гентамицин»

Бактерии *L. rhamnosus*, составляющие основу препарата «Лактобактерин», также не изменили свою морфологию, как и в предыдущем опыте. Влияние антибиотика «Гентамицин» ингибировало рост этих бактерий около лунок на расстоянии 4-2 мм, но не оказало никакого сдвига в морфологии лактобактерий (Приложение, рисунок 2). Можно судить о том, что данный вид молочнокислых бактерий не является чувствительным к антибиотику, который оказывает бактерицидное действие.

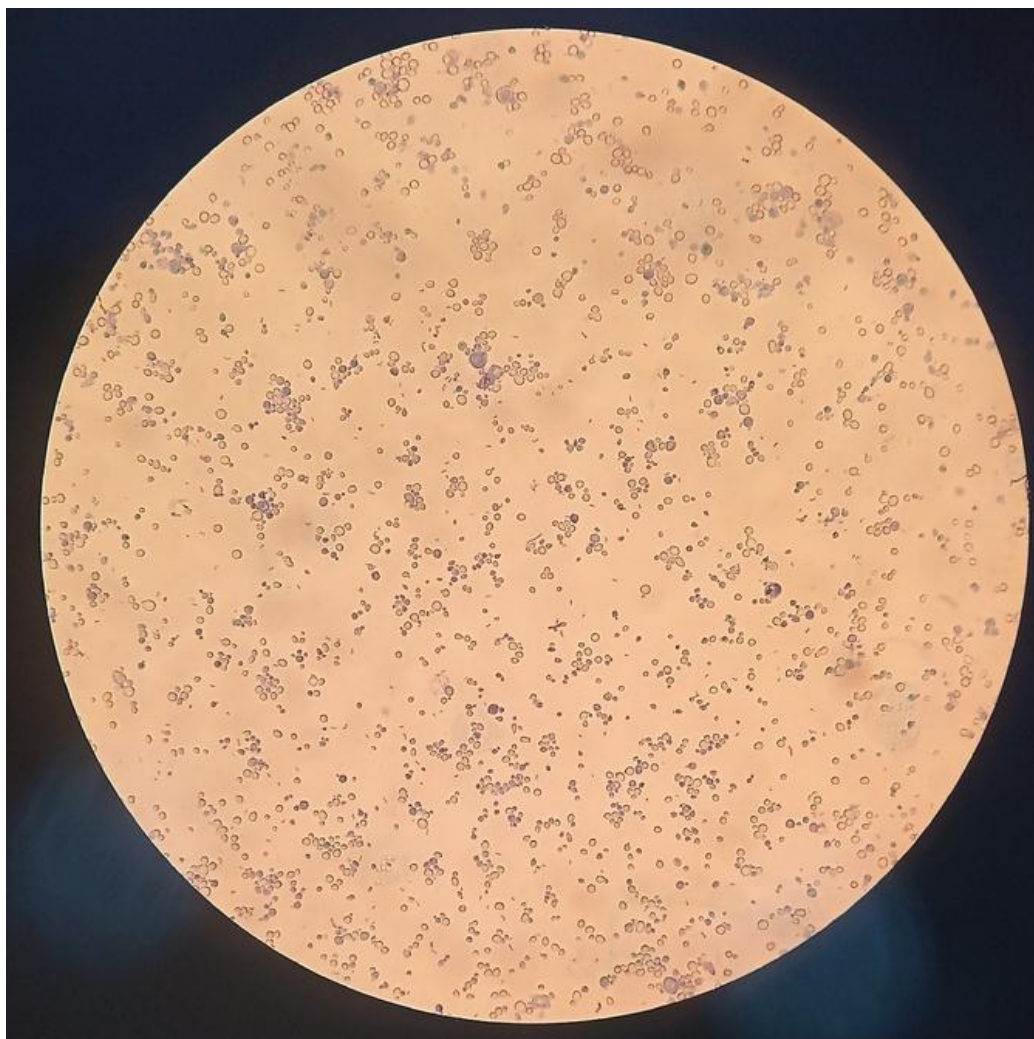


Рисунок 13. Бактерии *L.acidophilus*, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS наличие антибиотика «Гентамицин»

Второй образец молочнокислых бактерий, содержащийся в биологически активной добавке «Наринэ» по измерениям расстояния зоны ингибирования роста проявляет устойчивость к антибиотику «Гентамицин» в таблице 2. В ходе наблюдения за морфологией *L.acidophilus* изменений не обнаружено, можно увидеть как одиночные бактерии в форме округлых палочек так и небольшие колонии. Этот вид молочнокислых бактерий не проявил чувствительности к антибиотику (Приложение, рисунок 4), однако, результаты, получаемые при оценке чувствительности к гентамицину, нельзя экстраполировать на другие аминогликозиды.

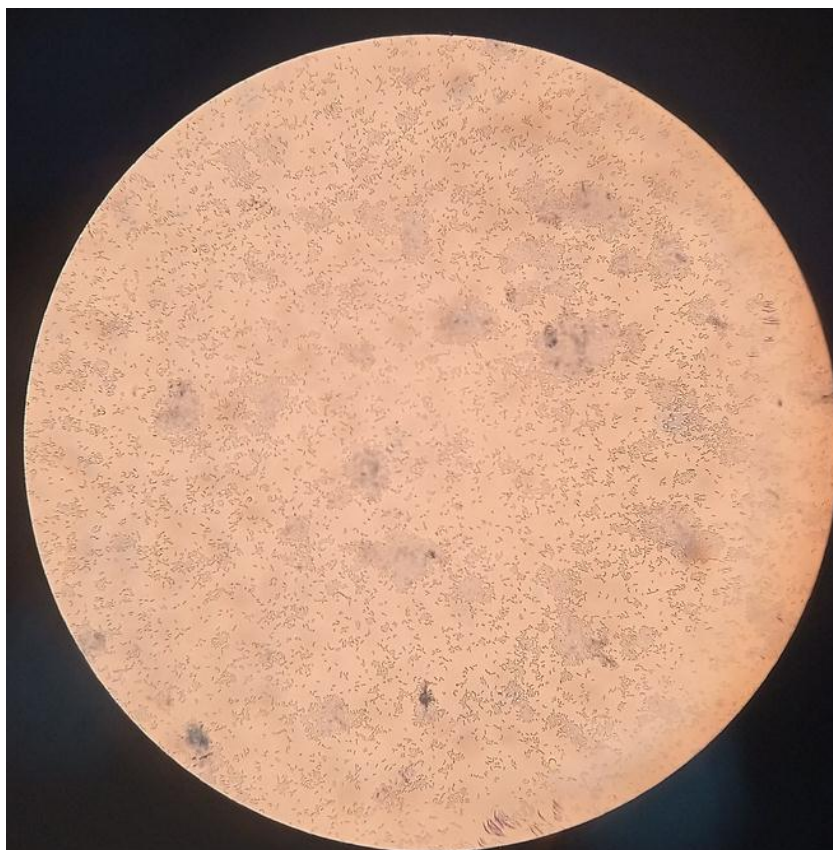


Рисунок 14. Бактерии L.casei, окрашивание метиленовой синькой, подкисленная среда MRS наличие антибиотика «Гентамицин»

Молочнокислые бактерии, содержащиеся в продукте «Актимель» не проявили чувствительности к антибиотику «Гентамицин» (Приложение, рисунок 3), что подтверждает пробиотические свойства исследуемых лактобактерий. Морфология клеток не изменилась, располагаются индивидуально, иногда кооперируются в небольшие скопления.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что в целом все изученные культуры молочнокислых бактерий обладали устойчивостью к двум антибиотикам. Особую устойчивость к проверенным антибиотикам проявляет штамм молочнокислых бактерий *L. acidophilus*. Эти данные позволяют удостовериться в пробиотических свойствах исследуемых лактобактерий. Проведение эксперимента с антибиотиком «Бензилпенициллин» на изучение устойчивости лактобактерий к антибиотику является следующей задачей нашего исследования.

ГЛАВА 4. НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА ДЛЯ ШКОЛЬНИКОВ

Тема: «Устойчивость лактобактерий к антибиотикам»

По результатам наших исследований мы предлагаем провести научно – исследовательскую работу по биологии в 10 классе, которая рассчитана на 24 часа по 2 часа в неделю. Главным будет являться поэтапное осуществление познавательного процесса путем непосредственного участия в нем ученика.

Эта работа, позволит школьникам расширить и углубить свои знания и умения, приобретенные при изучении основного курса. Помимо того, позволит учащимся сформировать и закрепить навыки самообразования, культуру мышления, приобщить школьников к научно – исследовательской работе. Также приобретенные знания будут способствовать выбору будущей профессии, так как биология является теоретической основой для медицины, экологии, биотехнологии и других сфер человеческой деятельности.

Цель: развить интерес к практической биологии у учащихся 10 класса.

Задачи:

1. Расширение знаний учащихся через изучение устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам.
2. Формирование умений безопасного и эффективного использования лабораторного оборудования.
3. Формирование аналитического и критического мышления.
4. Овладение умениями сравнивать, анализировать, проводить эксперименты, оценивать полученные результаты.
5. Овладение научным подходом к решению поставленных задач.

Работа, выполняемая до проведения опыта: подготавливают посуду к стерилизации, 6 чашек Петри, пипетки перед стерилизацией закрывают пленкой. Чашки Петри стерилизуют, завернув их в бумагу по 1-5 штук, в

бумагу заворачивают и пипетки. Подготовить к стерилизации 2 стеклянных стакана и 1 колбу. Для этого чистые стаканы и колбы закрывают пленкой. Приобретение биологически активной добавки «Наринэ» и питьевого йогурта «Актимель», антибиотик «Линкомицин» в аптеке, подкисленную среду MRS и недостающие материалы, оборудование для эксперимента в интернет – магазине лабораторного оборудования и реагентов для микробиологии.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри (6 шт.), шпатели Дригальского из алюминиевого сплава (2 шт.), пипетки (2шт.), стеклянные стаканы на 20 мл (2 шт.) колба на 300 мл с питательной средой MRS, препараты с лактобактериями, водяная баня, термостат, микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, метиленовая синь Лефлера, фильтровальная бумага, лупа, металлический цилиндр, спиртовка, дистиллированная вода, марлевая повязка, перчатки.

Ход работы:

1. Растопить приготовленную питательную среду MRS и разлить по чашкам Петри толщиной 3-5 мм.

2. Пока застывает питательная среда в чашках Петри, разбавляем в первом стакане 5 мл дистиллированной воды и содержимое одного пакетика «Наринэ», во второй стакан налить 6 мл йогурта «Актимель».

2.1. Посев на питательные среды производят шпателем Дригальского, окуная шпатель в стакан с лактобактериями, и аккуратно проводят им по всей площади поверхности среды с соблюдением правил асептики. Для каждого образца лактобактерий предназначено по 3 чашки Петри.

2.2. После посева чашки Петри с засеянными средами подписывают и помещают в термостат при температуре 37°C на 24 часа.

3. Выполненные посевы культур лактобактерий через сутки вынимают из термостата, проверяют равномерность прорастания газона микроорганизмов на питательной среде.

3.1. Затем в каждой чашке Петри стерильным металлическим цилиндром диаметром 8 мм проделывают 6 лунок на расстоянии 20 мм друг от друга, как изображено на фото:



Рисунок 15. Диффузионный метод лунок определения устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам

3.2. В каждую лунку стерильной пипеткой вносят по одной капле антибиотика «Линкомицин» из ампул, затем закрывают чашки Петри и ставят в термостат при температуре 37°C на сутки.

4. После термостатирования все чашки Петри с культурами лактобактерий «Наринэ» и «Актимель» и антибиотиком проверяют на наличие зон ингибирования роста бактерий около лунок с «Линкомицином».

4.1. Чувствительность лактобактерий к антибиотику определяют по наличию и размеру зоны замедления роста. Отсутствие роста тест – микроорганизма на расстоянии более 10 мм от диска с антибиотиком указывает на чувствительность штамма. Если же тест-микроорганизм развивается в непосредственной близости от диска, пропитанного антибиотиком, то это означает, что данный микроорганизм устойчив к действию антибиотика. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряют с точностью до 1 мм. Данные заносят в таблицу 3.

Таблица 3 – Устойчивость молочнокислых бактерий рода *Lactobacterium* к антибиотикам.

Антибиотик	Зона ингибирования роста, мм					
	<i>L. acidophilus</i>			<i>L.casei</i>		
	3 повторности			3 повторности		
Линкомицин						

4.2. По результатам измерения делают вывод о том, насколько чувствительны или устойчивы лактобактерии к антибиотику.

5. Для наблюдения за изменением морфологических свойств лактобактерий, берут мазок культуры с питательной среды.

5.1. Производят окрашивание метиленовой синью: чистое предметное стекло смачивают насыщенным водным раствором метиленового синего. Когда краска на стекле высохнет, его протирают сухой тряпочкой до нежно-голубой окраски. На подготовленное таким образом стекло наносят каплю исследуемой культуры, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

6. Вывод: когда мы здоровы, в состав микрофлоры кишечника входят пробиотические молочнокислые бактерии, однако после антибиотикотерапии или во время нее, микрофлора кишечника становится уязвимой и иммунитет человека ослабевает. Для профилактики и лечения дисбактериоза используют пробиотики, содержащие молочнокислые бактерии, которые в свою очередь устойчивы к воздействию на них антибиотиков, тем самым восстанавливая микрофлору желудочно-кишечного тракта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные в ходе наших экспериментов можно рассматривать как подтверждение пробиотических свойств исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, их способностью функционировать в желудочно-кишечном тракте человека при приеме антибиотиков. По результатам опытов мы убедились, что степень устойчивости исследуемых нами лактобактерий к антибиотикам высокая, как и описывалось в изученных работах [10, 11, 18].

Устойчивость лактобактерий к ряду антибиотиков подтверждает реальность применения биологически активных добавок и молочных продуктов на их основе не только для коррекции дисбиоза, появившегося после антибиотикотерапии, но и, что более важно, с профилактической целью во время курса лечения для предотвращения изменения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры.

Нам удалось прорастить ровный культуральный газон лактобактерий на питательных средах, после чего используя диффузионный метод лунок, мы определили устойчивость микроорганизмов к антибиотикам. Метод оказался достаточно эффективным для наглядного эксперимента, были явно заметны зоны ингибирования роста лактобактерий, что позволило точно провести измерения. По результатам микроскопирования видимых изменений морфологии кисломолочных бактерий антибиотики не вызывают.

В целом все изученные культуры молочнокислых бактерий обладали устойчивостью к двум антибиотикам. Особую устойчивость к проверенным антибиотикам проявляет штамм молочнокислых бактерий *L. acidophilus*, входящий в основу биологически активной добавки «Наринэ». Два других образца такие как, «Лактобактерин» и «Актимель» также резистентны к антибактериальным препаратам «Линкомицин» и «Гентамицин». Проведение эксперимента с антибиотиком «Бензилпенициллин» на изучение

устойчивости лактобактерий к антибиотику является следующей задачей нашего исследования.

Также нами была разработана методика научно – исследовательской работы для школьников, с целью расширения, углубления и применения знаний у учащихся в сфере микробиологии, основах правильного питания и медицины. В ходе проведения работы у учащихся формируются:

- овладение навыками и методами работы по культивированию микроорганизмов;
- овладение навыками работы с различными литературными источниками, поиска информации по заданной проблематике;
- формирование научного мировоззрения, обеспечение интеллектуального развития личности;
- постижение методов самостоятельной познавательной деятельности;
- применение полученных знаний для решения научных, учебных, практических, методических, информационно-поисковых задач;
- понимание главных аспектов на пути сохранения и поддержания своего здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Е.А., Яруллина Д.Р. Механизмы устойчивости пробиотических лактобацилл к антибиотикам различных классов // Тезисы докладов 72-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. № 7. С. 28 .
2. Анисимова Е.А., Яруллина Д.Р. Характеристика антибиотикорезистентности пробиотических штаммов лактобацилл // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. 2019. №6. С. 6-8.
3. Бельская Н.А., Черкес Ф. К., Богоявленская Л. Б. Микробиология: учебник. Москва: Альянс, 2014. 512 с.
4. Дроздова И. В. Удивительная биология. Москва: НЦ ЭНАС, 2018. 67с.
5. Ганина В.И. Пробиотики. Название, свойства, и основы биотехнологии: учебник. Москва: МГУПБ, 2001. 122 с.
6. Горохова И.В. Характеристика устойчивости пробиотических лактобацилл к антибиотикам // Тезисы докладов 72-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. №7. С. 68.
7. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: учебник. Москва: Медицина, 2013. 110 с.
8. Глазачев В.В. Кисломолочные продукты. Москва: Пищевая промышленность, 2015. 268с.
9. Гусин И. Б., Сирик В. И., Чекулаева Л. В. Технология молока и молочных продуктов. Москва: Пищевая промышленность, 2016. 140 с.
10. Китаевская С.В., Резистентность пробиотических штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам. Казань: Вестник технологического университета, 2012. 184-186 с.

11. Лисеенко И. В. Влияние антибиотиков на молочнокислые бактерии // Юный учёный. 2015. №2. С. 120-123.
12. Покровский В. И. Медицинская микробиология. Москва: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2009. 1200 с.
13. Руш К., Руш Ф. Микробиологическая терапия. Москва: Арнебия, 2011. 160 с.
14. Седов А. А. Медицинская микробиология. Москва: Приор-издат., 2013. 5-9 с.
15. Фахруллин Р.Ф., Яруллина Д. Р. Учебно-методическое пособие по микробиологии: учеб. Пособие / Казанский университет. Казань, 2014. 51 с.
16. Хавкин А. И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // Русский медицинский журнал. 2003. № 3. С. 17-21.
17. Антибиотики [Офиц. сайт]. URL: <http://www.antibiotic.ru/antibiotics.php>. (Дата обращения: 23.04.2020).
18. Антибиотики и антимикробная активность. URL: <http://www.antibiotic.ru/antibiotics.php>. (Дата обращения: 23.10.2019).
19. Бактерии здоровья [Офиц. сайт]. URL: <https://narine.okis.ru/importance.html>. (Дата обращения: 16. 02.2020).
20. Кисломолочные продукты российского рынка. URL: https://studbooks.net/2498258/tovarovvedenie/analiz_rynka_kislomolochnyh_produktov_rossii. (Дата обращения: 20.10.2019).
21. Лечение заболеваний. URL: <https://womenknow.ru/1798-kak-prinimat-antibiotiki-i-probiotiki.html>. (Дата обращения: 08.12.2019).
22. Медицина. Механизм действия антибиотиков. URL: <https://medichelp.ru.turbopages.org/s/medichelp.ru/uchebnik/mikrobiologija/5091-mehanizm-deystviya-antibiotikov.html>. (Дата обращения: 23.10.2019).
23. Медицинская микробиология: конспект лекций для ВУЗов. URL: <https://kartaslov.ru/книги/> 17. (Дата обращения: 29.10.2019).

24. Мир Знаний. Производство антибиотиков. URL: <https://mirznanii.com/a/153149/proizvodstvo-antibiotikov>. (Дата обращения: 03.09.2019).
25. Пищеварение (сайт о заболеваниях ЖКТ). URL: <https://aybri.ru/bolezni-zheludka/molochnokislye-bakterii-eto-chto-za-organizmy-ih-sreda-obitaniya-i-poleznye-svoystva.html>. (Дата обращения: 23.11.2019).
26. Полезное и правильное питание [Офиц. сайт]. URL: <https://blisswoman.ru/zdorove/lactobacillus-rhamnosus-polza-v-kakih-preparatah-soderzhatsya>. (Дата обращения: 08.02.2020).
27. Правильное питание. URL: <https://www.sportobzor.ru/diety-pravilnoe-pitanie/vazhnye-funkcii-prisushchie-laktobakteriyam.html>. (Дата обращения: 08.09.2019).
28. Пробиотики и их значение [Офиц. сайт]. URL: <https://probakterii.ru/prokaryotes/for-human/molochnokislye-bakterii.html>. (Дата обращения: 20.11.2019).
29. Функциональная гастроэнтерология [Офиц. сайт]. URL: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/3170>. (Дата обращения: 21.01.2020).
30. Электронная библиотека диссертаций [Офиц. сайт]. URL: <https://www.dissercat.com/content/biologicheskaya-kharakteristika-proizvodstvennykh-shtamov-laktobakterii>. (Дата обращения: 08.12.2019).

ПРИЛОЖЕНИЕ

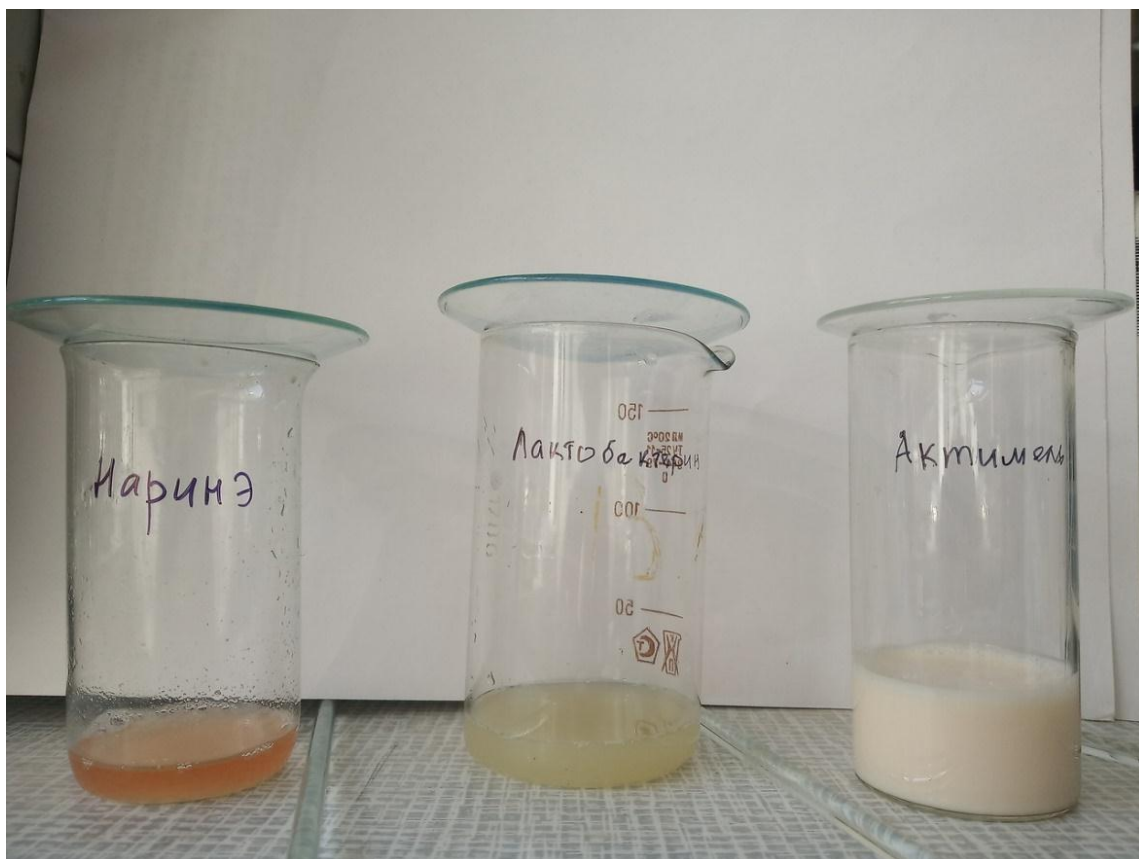


Рисунок 1. Разведенные лиофилизаты лактобактерий БАДа «Наринэ», препарата «Лактобактерин» и в чистом виде пищевой йогурт «Актимель»



Рисунок 2. Питательная среда MRS, посев газонем лактобактерий из препарата «Лактобактерин», антибиотик «Гентамицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок (фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)



Рисунок 3. Питательная среда MRS, посев газоном лактобактерий питьевого йогурта «Актимель», антибиотик «Гентамицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок(фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)

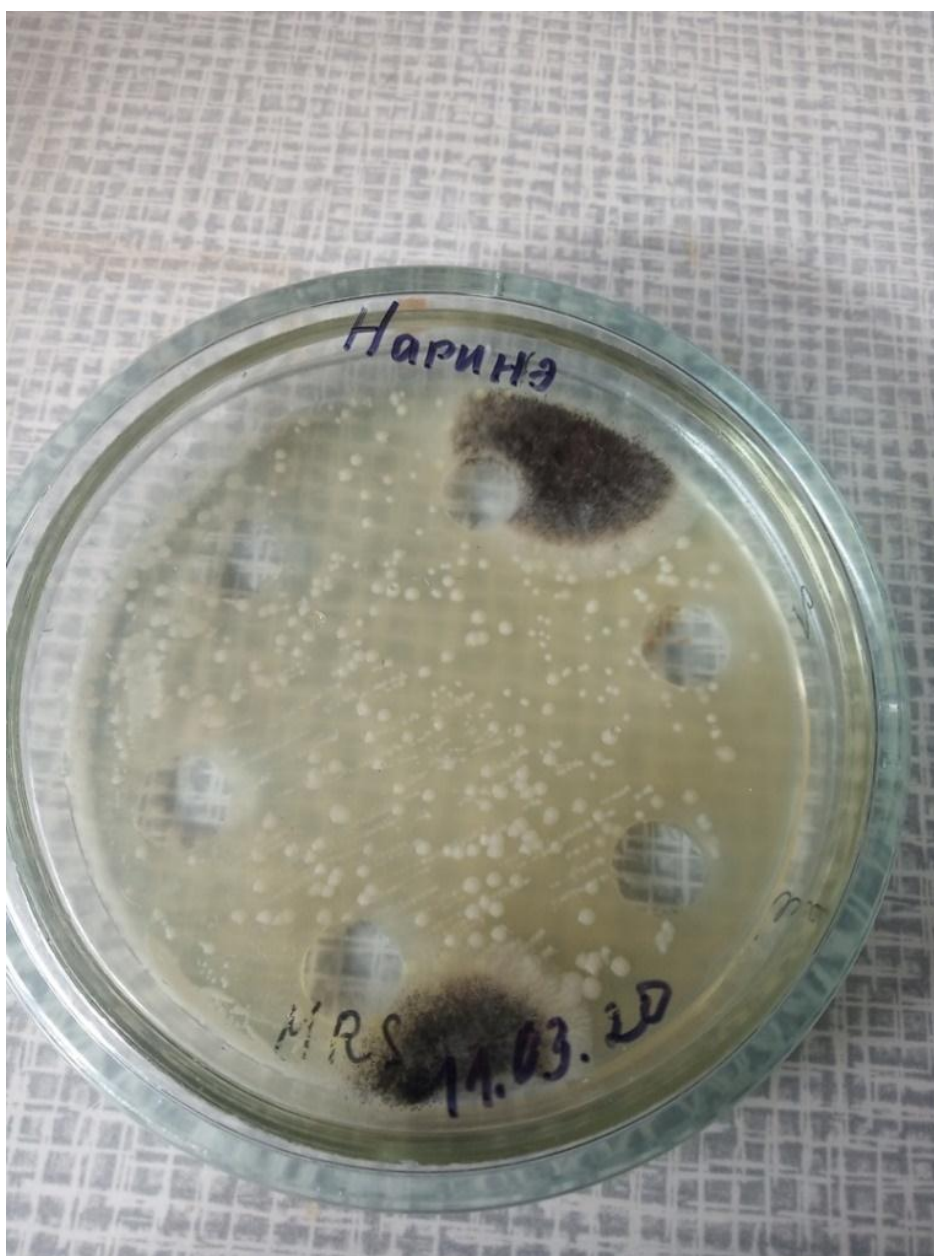


Рисунок 4. Питательная среда MRS, посев газоном лактобактерий БАДа «Наринэ», антибиотик «Гентамицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок(фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)



Рисунок 5. Питательная среда MRS, ровный посев газоном лактобактерий питьевого йогурта «Актимель», после 24 часов термотатирования при 37°C

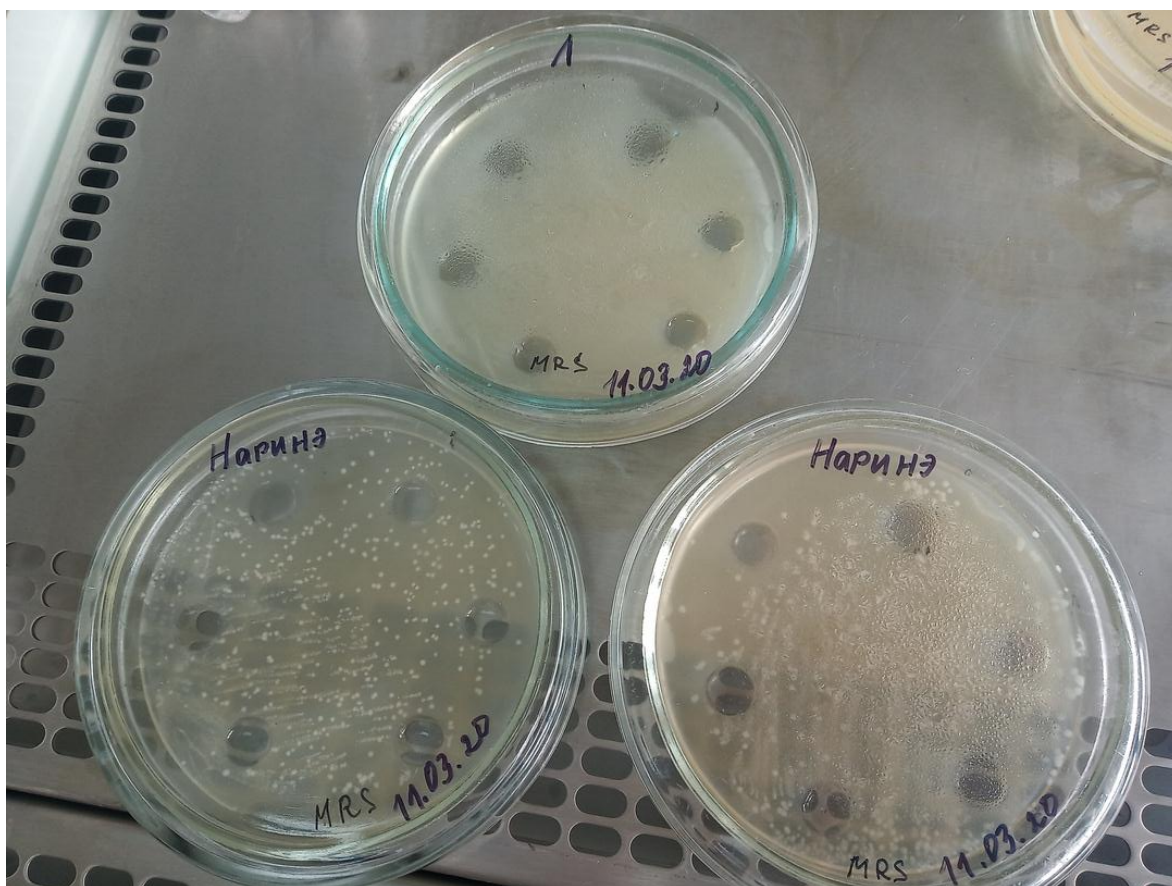


Рисунок 6. Питательная среда MRS, посев лактобактерий питьевого йогурта «Актимель», БАДа «Наринэ», препарата «Лактобактерин», антибиотик «Линкомицин», только что внесенный в среду диффузионным методом лунок

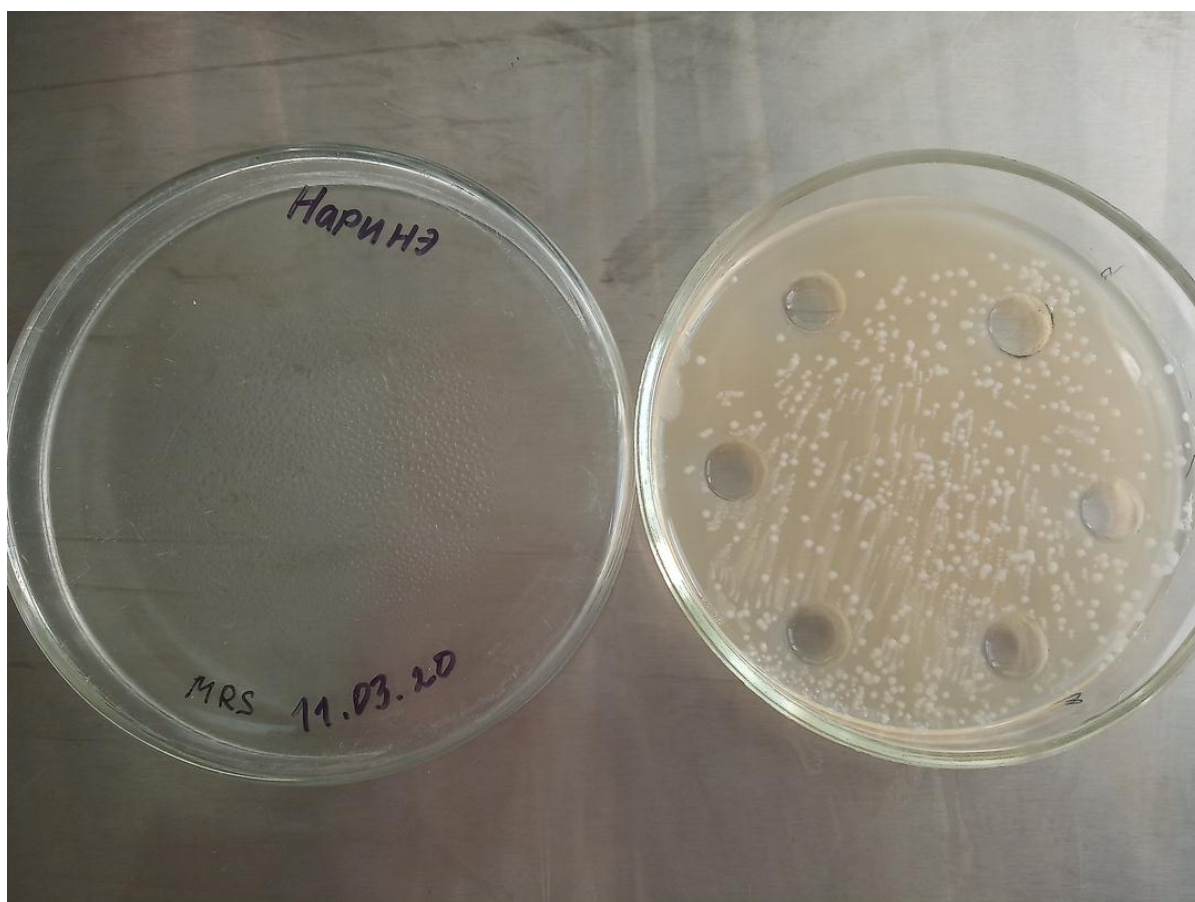


Рисунок 7. Питательная среда MRS, посев лактобактерий из БАДа «Наринэ», антибиотик «Линкомицин», только что внесенный в среду диффузионным методом лунок

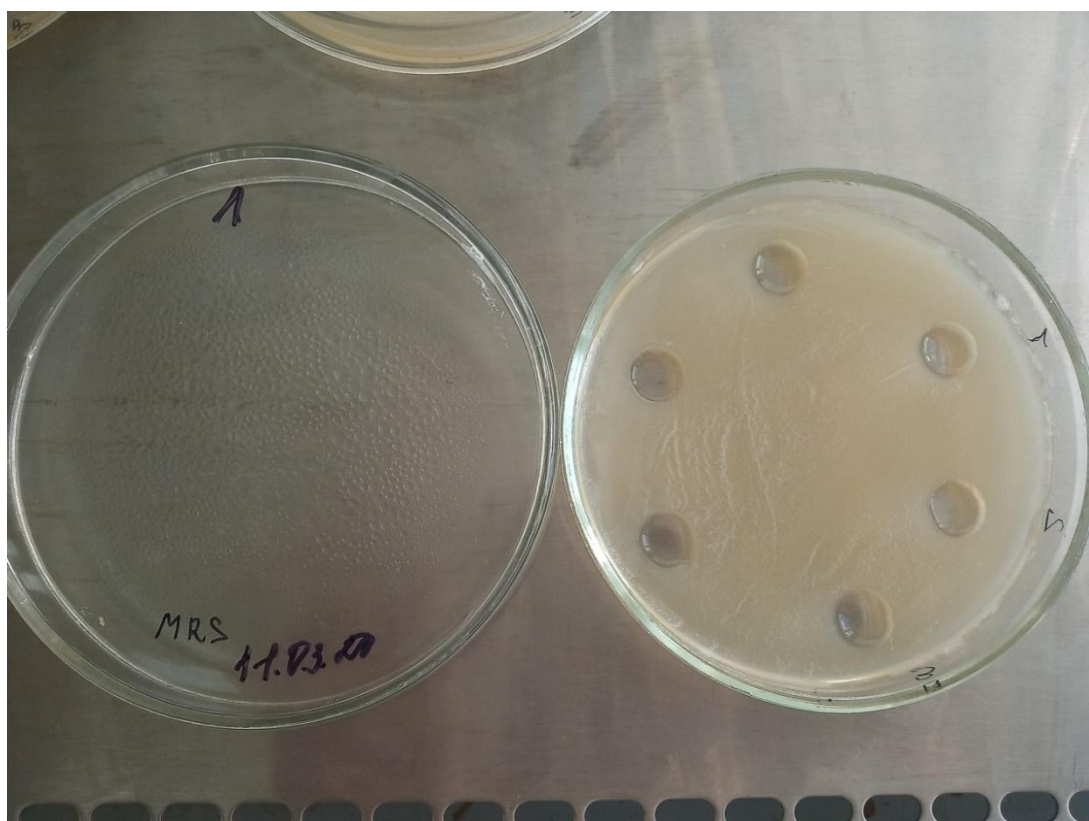


Рисунок 8. Питательная среда MRS, посев лактобактерий из препарата «Лактобактерин», антибиотик «Линкомицин», только что внесенный в среду диффузионным методом лунок

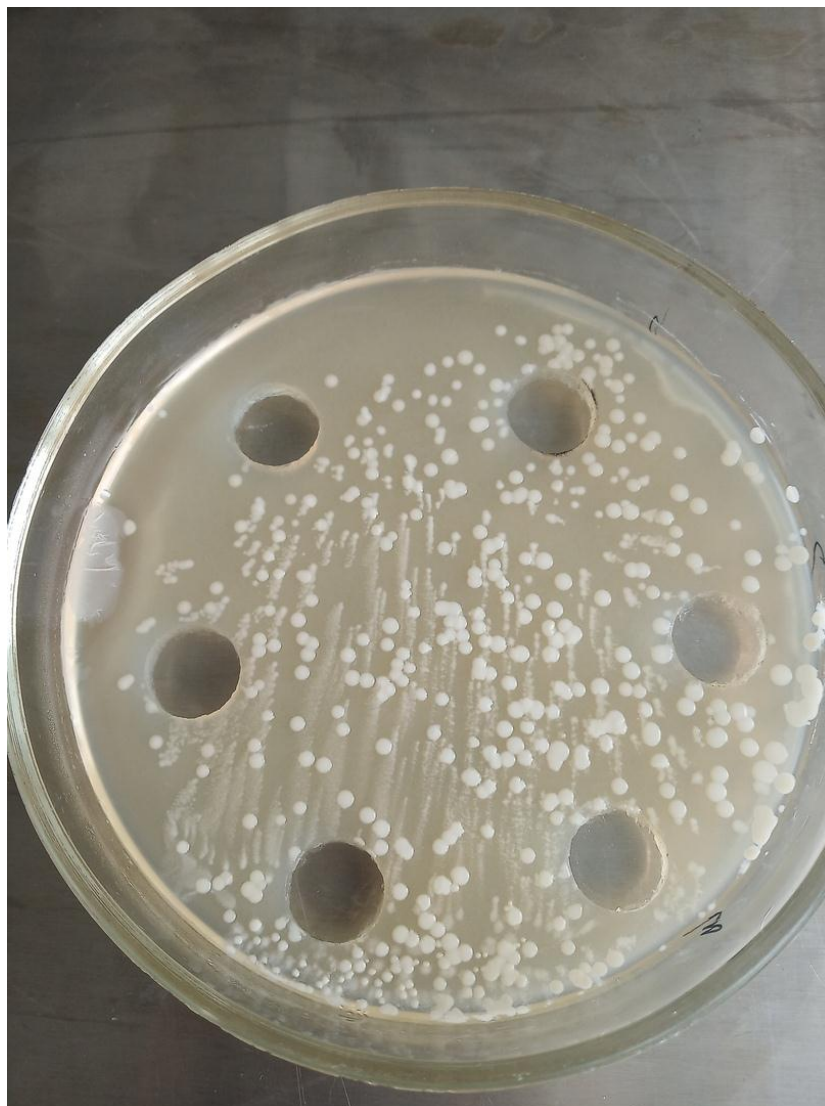


Рисунок 9. Питательная среда MRS, посев лактобактерий из БАДа «Наринэ», антибиотик «Линкомицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок (фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)

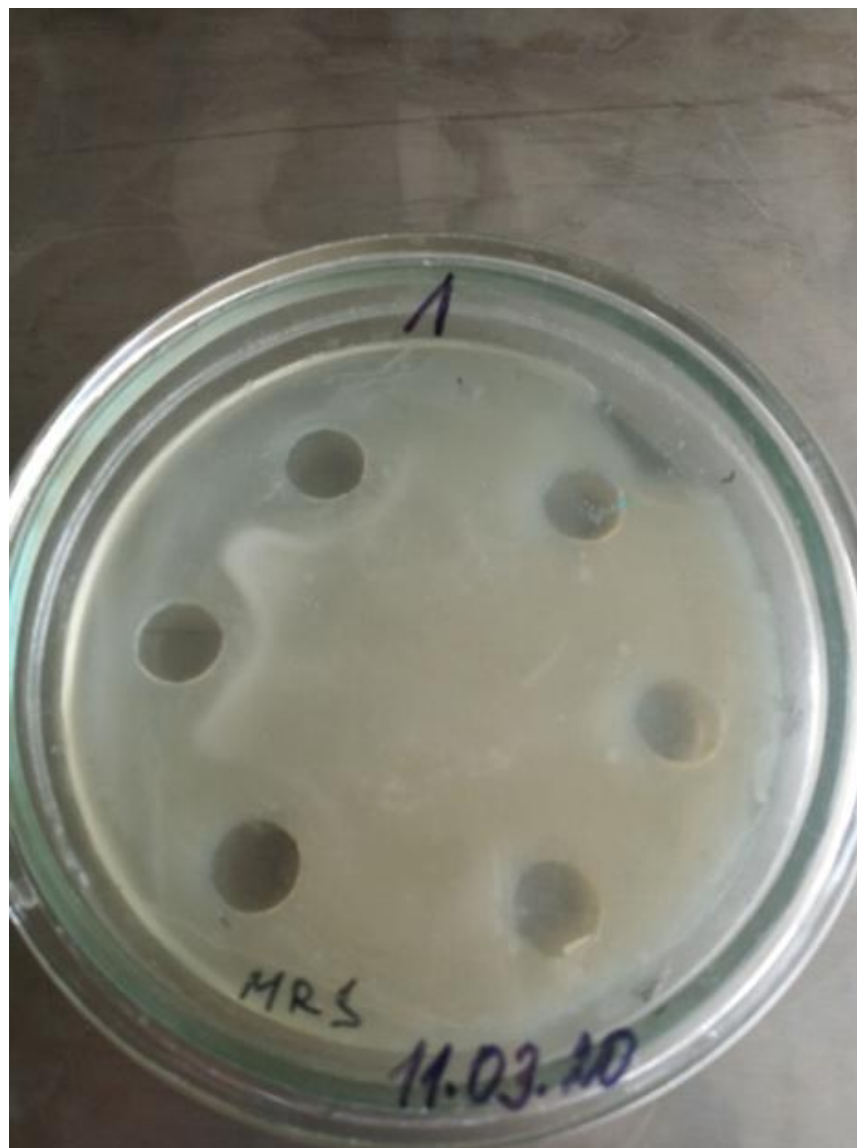


Рисунок 10. Питательная среда MRS, посев лактобактерий из препарата «Лактобактерин», антибиотик «Линкомицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок (фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)

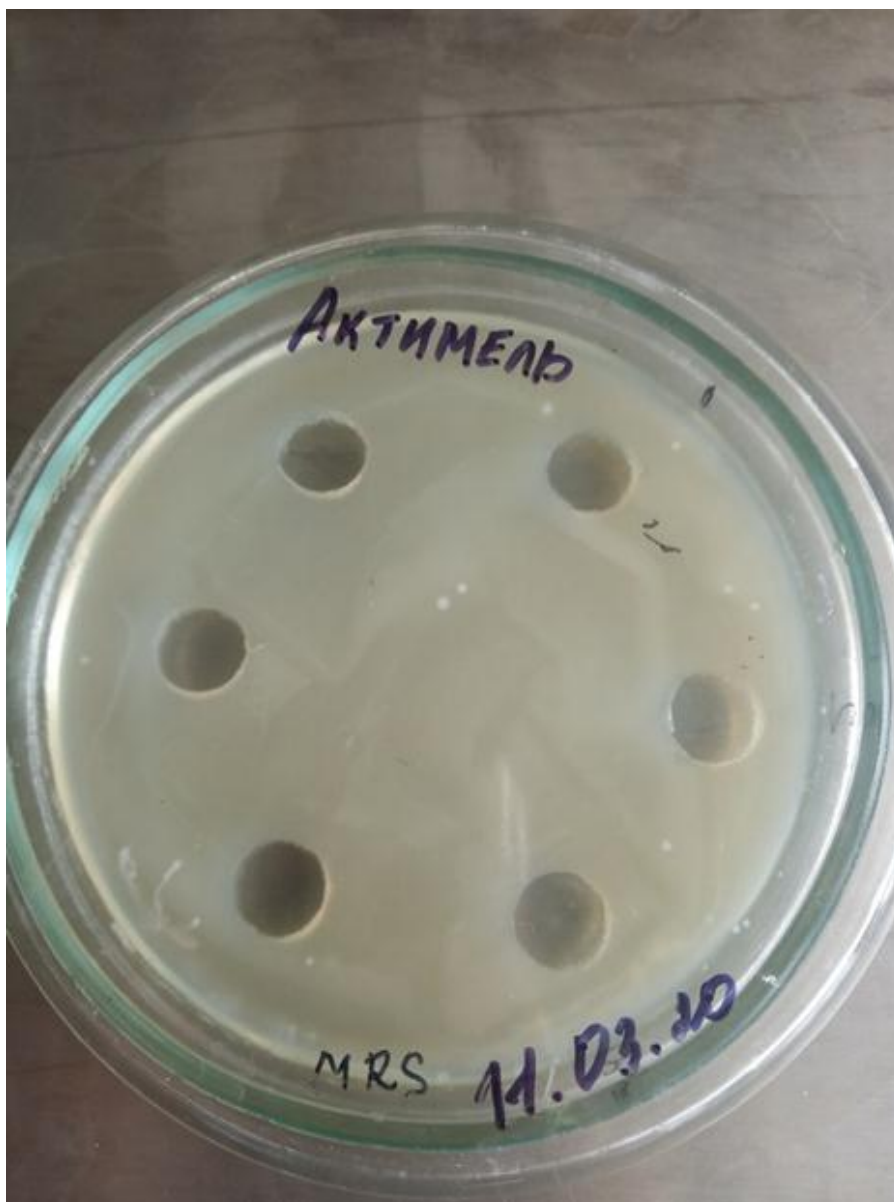


Рисунок 11. Питательная среда MRS, посев лактобактерий питьевого йогурта «Актимель», антибиотик «Линкомицин», внесенный в среду диффузионным методом лунок (фото сделано после 30 часов термостатирования при 37°C)

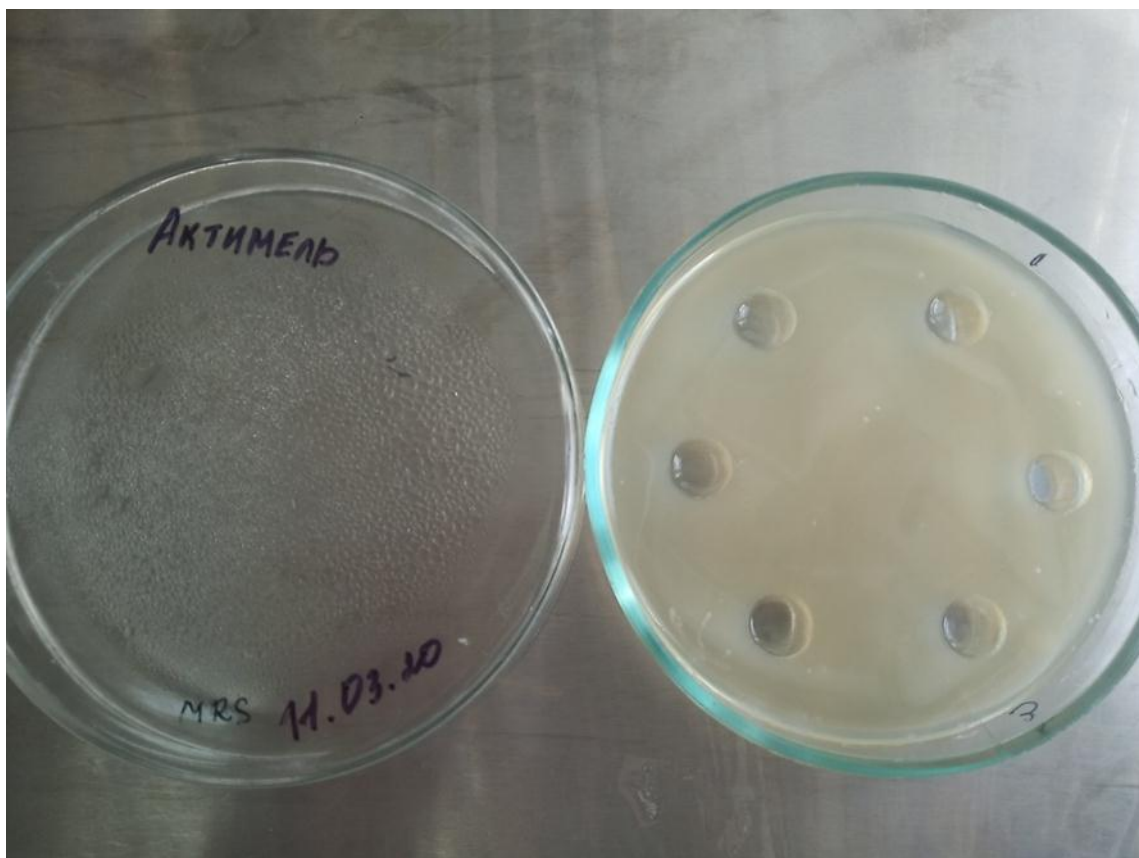


Рисунок 12. Питательная среда MRS, посев лактобактерий питьевого йогурта «Актимель», антибиотик «Линкомицин», только что внесенный в среду диффузионным методом лунок



Рисунок 13. Фильтрация гидролизованного молока в колбы через складчатый фильтр

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
44.03.05 Педагогическое образование
Профили подготовки «Биология. Химия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова

« 5 » 11 2019 г.

Задание

По ВКР студента Тихоновой Ирины Игоревны

Тема работы «Изучение устойчивости молочнокислых бактерий к
антибиотикам в научно-исследовательской деятельности школьников»

Утверждена приказом по Университету от «29» октября 2019 г. № 1183а/о

Срок сдачи студентом законченной работы «26» мая 2020 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки вы- полнения этапов	Примечания
1.	Выбор темы и обоснование ее актуальности. Определение объектов изучения	ноябрь - декабрь 2019	выполнено
2.	Сбор и анализ литературных данных. Написание обзора литературы.	январь 2019	выполнено
3.	Анализ ФГОС и программ по биологии среднего общего образования	февраль 2019	выполнено
4.	Изучение методик культивирования бактерий и подбор соответствующих антибиотиков. Постановка эксперимента.	март 2020	выполнено
5.	Разработка содержания научно-исследовательской работы школьников с лактобактериями.	апрель 2020	выполнено
6.	Разработка практических заданий НИР. Анализ результатов эксперимента	апрель 2020	выполнено
7.	Подготовка доклада для защиты ВКР	май 2020	выполнено
8.	Проверка ВКР в системе «Антиплагиат»	май 2020	выполнено
9.	Сдача оформленных и переплетенных экземпляров ВКР	май 2020	выполнено

Дата выдачи задания «5» ноября 2019 г.

Руководитель



Заплатин Б. П.

Задание принял к исполнению



**ОТЗЫВ
РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

Тема выпускной квалификационной работы «Изучение устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам в научно-исследовательской деятельности школьников»

Автор (студентка) Тихонова Ирина Игоревна

Факультет физико-математических и естественных наук

Кафедра «Общая биология и биохимия»»

Группа 15ФПЕ1

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование

Профили подготовки Биология. Химия

Руководитель Заплатин Борис Петрович, доцент кафедры «Общая биология и биохимия»,
доцент, кандидат биологических наук.

Показатели оценки выпускной квалификационной работы

Показатель оценивания	Критерии			
	Отлично	Хорошо	Удовлетв.	Неудовл.
Актуальность и обоснование выбора темы	+			
Логика работы, полнота и соответствие теме	+			
Уровень владения предметными знаниями	+			
Самостоятельность	+			
Достоверность выводов	+			
Оформление ВКР	+			
Качество подготовленного доклада	+			
Литература	+			
Возможность внедрения	+			
Общая оценка	отлично			

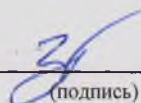
Отмеченные достоинства:

- заинтересованность в теме;
- ответственный подход к заданию и самостоятельность в написании работы;
- высокий уровень владения предметными знаниями и стремление к практической направленности работы.

Отмеченные недостатки: существенных недостатков в ВКР нет, отмечены мелкие недочеты в оформлении работы.

Заключение: Работа И.И. Тихоновой представляет собой самостоятельное исследование, отвечает всем требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, и допускается к защите.

Руководитель: _____


(подпись)

«8» июня 2020 г.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Тихонова Ирина Игоревна
Подразделение	Кафедра «Общая биология и биохимия»
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	Изучение устойчивости молочнокислых бактерий к антибиотикам в научно-исследовательской деятельности школьников
Название файла	Тихонова Ирина (03) 15 фпе1 НИР школьников_устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам.txt
Процент заимствования	35.35 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	11.59 %
Процент оригинальности	53.06 %
Дата проверки	02:15:45 08 июня 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Модуль поиска "Интернет Плюс"; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по elibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Медицина; Диссертации и авторефераты НББ; Модуль поиска перефразирования eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирования Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска "ПГУ"; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Заплатин Борис Петрович ФИО проверяющего
Дата подписи	8.06.2020 Подпись проверяющего

