

ОСВОЕНИЕ ОБЩЕКУЛЬТУРНЫХ, ОБЩЕПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ И ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИЗУЧЕНИЮ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Садуллоева Т.И., Суслов В.С., Сизенцов Я.А.,
Гезольдова А.А., Аслаева А.З., Филиппова О.А., Сагиева А.Б.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»**

В процессе обучения в высшем учебном заведении перед научным руководителем должна ставиться задача направленная на формирование у студента компетентного подхода в освоении теоретических знаний и получении практических навыков. При этом наиболее перспективным направлением в освоении компетенций является выполнение экспериментальных исследований, так как в процессе их выполнения обучающийся не только накапливает необходимый профессиональный опыт, но и учится работать в коллективе для достижения поставленных перед ними задач

Биологическое образование является одним из наиболее приоритетных направлений исследования, так как оно включает в себя различные аспекты взаимодействия как между живыми системами, так и взаимодействие живых организмов с неживой природой, что существенно расширяет спектр исследовательской деятельности студента.

В процессе исследования студенту необходим высокий уровень самоорганизации, так как от качества выполнения поставленной перед ним задачи зависит не только результативность его исследования, но и конечный итог реализации поставленной перед группой студентов цели.

В данной публикации рассмотрим формирование компетенций у студентов в ходе выполнения экспериментальных исследований по изучению антибиотикорезистентности и антибиотикопродуктивности пробиотических микроорганизмов.

Так в ходе реализации поставленной перед студентами общей цели исследования студентами освоены следующие компетенции: ОК-6 способностью работать в коллективе, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия; ОК-7 способностью к самоорганизации и самообразованию; ОПК-3 способностью понимать базовые представления о разнообразии биологических объектов, значение биоразнообразия для устойчивости биосферы, способностью использовать методы наблюдения, описания, идентификации, классификации, культивирования биологических объектов; ОПК-5 способностью применять знание принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности; ОПК-11 способностью применять современные представления об основах биотехнологических и биомедицинских производств, генной инженерии, нанобиотехнологии, молеку-

лярного моделирования; ПК-2 способностью применять на практике приемы составления научно-технических отчетов, обзоров, аналитических карт и пояснительных записок, излагать и критически анализировать получаемую информацию и представлять результаты полевых и лабораторных биологических исследований; ПК-4 способностью применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов.

Работа студентов заключалась в пошаговом выполнении экспериментального блока, при этом за каждым из студентов было закреплено выполнение определенного блока исследования, от качества выполнения которого зависело выполнение проекта в целом.

Так перед студентами изначально ставилась следующая цель: изучить антибиотикопродуктивность и антибиотикорезистентность пробиотических штаммов микроорганизмов и определение аддитивного эффекта комплекса антибиотиков и пробиотиков в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Для реализации поставленной цели студентами предварительно был проведен анализ имеющихся литературных данных по выбранной тематике с подбором методов для выполнения экспериментального блока исследования. Непосредственно для реализации поставленных перед студентами задач использовались следующие методы исследований [1].

Метод определения антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus* с применением тест-систем «Bio Merieux». В данном методе студентами использовались тест-системы «Bio Merieux» (Франция), предназначенные для определения антибиотикорезистентности в течение от 18 до 24 ч. Они состоят из прозрачной полимерной пластинки, на каждой имеются по 20 микропробирок объемом 250 мкл, содержащих разные антибиотики различной концентрации.

В ходе выполнения данного блока экспериментов были получены следующие данные (таблица 1)

Основываясь на полученных данных студентами были сформированы группы антибиотиков для дальнейшего исследования с использованием диско-диффузионного метода (ДДМ). Данный метод основан на способности антибиотика диффундировать из стандартных дисков, пропитанных антибиотиками в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, засеянных на поверхность агара [1].

Таблица 1 – Сравнительная таблица по антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus*, с применением тест-систем «Bio Merieux»

Антибиотики	Исследуемые тест-организмы				
	<i>B. subtilis</i> 534	<i>B. cereus</i> 5832	<i>B. licheniformis</i> 31	<i>B. subtilis</i> 3	<i>S. enteritidis</i>
1	2	3	4	5	6
Penicilline	R	R	R	R	I
Ampicilline	S	I	R	I	S
Oxacilline	R	R	R	R	S
Amoxicilline	S	S	I	S	S
Piperacilline	S	S	S	S	S
Mezlocilline	S	S	S	R	S
Mecillinam	R	R	R	R	R
Streptomycine	I	I	I	I	I
Kanamycine	S	S	S	S	I
Gentamicine	S	S	S	S	I
Cefalotine	I	S	R	I	S
Cefotaxime	I	R	R	R	I
Ceftazidime	R	R	R	R	R
Cefactor	S	S	S	S	S
Cefsulodine	R	R	R	R	R
Cefamandole	S	S	R	R	S
Cefotetan	I	S	R	R	S
Cefoxitine	R	S	I	R	I
Cefoperazone	S	S	S	S	I
Latamoxef	S	S	I	S	S
Imipeneme	R	R	R	R	R
Aztreonam	R	R	R	R	R
Erythromycine	I	I	I	R	S
Pristinamycine	S	R	R	R	I
Tetracycline	R	S	S	R	S
Minocycline	I	S	S	R	S
Vancomycine	S	S	S	S	S
Lincomycine	R	R	R	R	S
Clindomycine	S	S	R	R	R
Chloram-	R	I	I	R	I
Colistine	R	R	R	R	S

R – устойчивость,
S – чувствительность,
I – умеренная чувствительность

При использовании этого метода в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, расположенные на горизонтальной поверхности, наливают по 20 мл расплавленного питательного агара. Перед посевом поверхность среды должна быть подсушена. В качестве посевного материала используется суточная культура тест-организма, приготовленная с агаровой культуры. 0,1 мл бактериальной взвеси наносится на поверхность агара и равномерно распределяется шпателем. Затем на поверхность засеянной среды стерильным пинцетом накладывают диски, пропитанные различными антибиотиками. В каждой чашке может быть испытано действие нескольких антибиотиков (до пяти или шести). Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 37 °С в течение от 18 до 24 часов. Оценка результатов ведется по наличию зон задержки роста микробов вокруг дисков, что свидетельствует либо о чувствительности возбудителя к препарату, либо об его устойчивости.

Отсутствие роста тест-организма на расстоянии более 10 мм от диска с антибиотиком будет указывать 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 (таблица 2).

В ходе выполнения данного блока исследования для дальнейшего исследования студентами были отобраны антибиотики для дальнейшего исследования методом серийных разведений. Данный метод используется для определения количества антибиотика в культуральных жидкостях, растворах или экстрактах. Для работы подготавливаем питательный бульон, пригодный для развития выбранного тест-организма. Непременное условие – бульон должен быть прозрачным. Одновременно с этим подготавливаем и культуру тест-организма. Стерильный питательный бульон разливаем в чистые стерильные пробирки. Количество бульона должно обеспечивать нужную степень разведения изучаемого антибиотика.

Подготавливаем ряд пробирок с питательным бульоном (по 5 мл). В первую пробирку вносим 5 мл испытуемого раствора антибиотика (разведение 1:1), тщательно перемешиваем и 5 мл смеси переносим во вторую пробирку (разведение 1:2). Затем 5 мл смеси последовательно переносим в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 пробирку в результате получая разведения 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512. Из последней пробирки 5 мл бульона удаляем. В полученный ряд разведений антибиотического вещества в каждую пробирку вносим по 0,05 мл клеток тест-организмов. Затем пробирки помещаем в термостат продолжительностью от 20 до 24 часов при температуре 37 °С. После этого в пробирках определяем визуально наличие или отсутствие роста тест-организма по сравне-

нию с контролями (таблица 3, 4). В опыте используются три контроля: контроль среды, контроль антибиотика, контроль микроорганизма. На основании получаемых количественных данных (диаметра зоны подавления роста антибиотика или значения МПК) микроорганизмы подразделяют на чувствительные, умеренно чувствительные и резистентные. Затем мы отбираем те антибиотики, к которым условно-патогенные микроорганизмы оказались умеренно чувствительными, а бактерии рода *Bacillus* – устойчивы, для дальнейшего совместного использования антибиотика и пробиотика.

Таблица 2 – Сравнительная таблица по антибиотикорезистентности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотиков, с применением ДДМ
В миллиметрах

Антибиотики	Исследуемые тест-организмы				
	<i>B. subtilis</i> 534	<i>B. cereus</i> 5832	<i>B. licheniformis</i> 31	<i>B. subtilis</i> 3	<i>S. enteritidis</i>
1	2	3	4	5	8
Penicilline	25,0±0,58	R	R	21,7±0,33*	20,7±0,67*
Ampicilline	26,0±0,58	17,7±0,33**	30,7±0,67	24,3±0,33*	25,7±0,67
Oxacilline	30,3±0,33	14,7±0,33**	26,0±0,58**	22,0±0,58**	R
Streptomycine	25,3±0,33	34,0±0,58	32,0±0,58	32,0±0,58	18,3±0,33**
Kanamycine	27,0±0,58	20,7±0,67*	25,0±0,58	25,0±0,58	22,0±0,58*
Gentamicine	35,0±0,58	30,3±0,88*	29,7±0,33**	29,3±0,33*	23,7±0,33**
Netilmicine	33,3±0,33	34,0±0,58	26,0±0,58***	32,3±0,88	21,3±0,67**
Cefalexine	35,0±0,58	29,7±0,33*	29,7±0,33**	32,3±0,67*	29,3±0,33*
Cefotaxime	36,3±0,67	20,0±0,58**	R	R	12±0,33***
Cefasoline	30,7±0,67	32,7±0,33	32,3±0,33	30,3±0,88	32,0±1,00
Cefixime	20,0±0,58	R	R	15,0±0,58*	29±1.76
Меропенем	34,0±0,58	32,0±0,58	29,3±0,67	35,3±0,33	30,0±0,58*
Imipeneme	45,7±0,67	38,0±1,15*	41,3±0,67*	41,0±0,58*	22,0±0,58**
Aztreonam	R	R	R	R	R
Vancomy-	21,3±0,8	17,7±0,33*	18,7±0,67	16,7±0,67*	22,7±0,33

cine	8				
Tetracycline	25,3±0,33	21,3±0,33*	22,7±0,33**	26,3±0,33	22,0±1,15*
Lincomycine	20,0±0,58	18,0±0,58	21,0±0,58	25,7±0,67	13,3±0,67*
Clindomycine	26,7±0,67	29,3±0,67	27,0±0,58	28,0±0,58	R
Erythromycine	33,0±0,58	28,3±0,88*	26,0±0,58**	30,3±0,33*	R
Chlorampheni-kol	R	22±0,91	24±0,58	27±0,17	13±0,21
Colistine	R	R	R	R	16,7±0,67

R – устойчивость к антибиотикам;
* P < 0,050; ** P < 0,010; *** P < 0,001.

На основании полученных данных была проведена статистическая обработка. Были посчитаны средние значения с ошибкой средней, достоверность результатов.

Параллельно с проводимыми исследованиями по определению антибиотикорезистентности перед другой группой студентов стояла задача изучить антибиотикопродуктивность исследуемых микроорганизмов.

Для реализации данного комплекса задач студентами использовались следующие методы:

1. Метод агаровых блочков (таблица 5). Изучаемый организм высеваем сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. После того как микроорганизм хорошо вырастет, пробочным сверлом (диаметр примерно 20 мм) вырезаем агаровые блочки, которые затем переносим в другие стерильные чашки Петри. В центр каждой чашки помещают по одному такому блоку

Таблица 3 – Определение МПК пенициллина методом последовательных разведений

Исследуемые объекты	Антибиотик	Разведение антибиотиков									
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Концентрация, ЕД		1 мл	500 тыс	250 тыс	125 тыс	62,5 тыс	31,2 тыс	15,6 тыс	7,81 тыс	3,9 тыс	1,95 тыс
<i>B. cereus</i>	Пенициллин	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Концентрация, г.	5	2,5	1,2 5	0,6 3	0,3 2	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
------------------	---	-----	----------	----------	----------	------	------	------	------	------

Таблица 4 – Определение МПК цефотаксима методом последовательных разведений

Исследуемые объекты	Антибиотик	Разведение антибиотиков									
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Концентрация, ЕД		1 мл н	500 тыс	250 тыс	125 тыс	62,5 тыс	31,25 тыс	15,63 тыс	7,81 тыс	3,9 тыс	1,95 тыс
<i>B. licheniformis</i> 3	Цефотаксим	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> 31		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Концентрация, г.		5	2,5	1,2 5	0,6 3	0,3 2	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01

Свободную часть чашки Петри заливают плотной питательной средой, пригодный для развития тест-организмов, с тем расчетом, чтобы уровень этого агара был на 1,5 мм ниже уровня блочка. Чашки с агаровыми блочками помещаем в термостат на время от 20 до 24 часов при температуре 37 °С. Если выделяемый организмом антибиотик подавляет развитие тест-организма, то вокруг агарового блочка образуется зона отсутствия роста. Чем больше выделяется антибиотика или чем активнее образуемое антибиотическое вещество, тем больше будет диаметр зоны подавления тест-организма [1].

Таблица 5 – Сравнительная таблица по антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* методом агаровых блочков

Название штамма	<i>B.subtillis</i> 534	<i>B.cereus</i> IP 5832	<i>B.licheniformis</i> 31	<i>B.subtillis</i> 3
<i>S. enteritidis</i>	26,0±0,58	22,7±0,33	23,3±0,33	24,3±0,67

2. Метод агаровых лунок (таблица 6) состоящий из следующих этапов:

а) В стерильные пробирки с МПБ внесли инокулят (бактерии рода *Bacillus*) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 48, 72 и 96 часов (длительный срок инкубирования связан с тем, что антибиотические вещества вырабатываются микроорганизмами в случае конкуренции за питательные вещества, либо при дефиците питательных веществ).

б) После инкубирования провели центрифугирование при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут. Фильтровали надсадочную жидкость с использованием стерильных надсадок на шприцы с PES мембраной (диаметр фильтра – 25 мм, диаметр пор – 0,22 мкм).

в) Подготовленные чашки Петри с МПА засеяли тест-организмами.

г) Затем в толще агаровой пластинки с помощью пробойного сверла сделали лунки диаметром 6 мм и внесли в них фильтрат, который должен содержать антибиотикоподобные вещества

д) Чашки поместили в термостат на время от 20 до 24 часов при температуре 37 °С. За это время вокруг колоний образуются зоны отсутствия роста тест-организма. Произвели замер диаметров зон, образовавшихся вокруг лунок.

Таблица 6 – Сравнительная таблица антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* методом агаровых лунок.

Название штамма	<i>B.subtillis</i> 534	<i>B.cereus</i> IP 5832	<i>B.licheniformis</i> 31	<i>B.subtillis</i> 3
<i>S. enteritidis</i>	11,0±0,58	8,7±0,33	10,3±0,33	9,3±0,67

3. Метод наложения дисков (таблица 7), пропитанных антибиотикоподобными веществами. Использовали следующую методику:

а) В мясо-пептонный бульон засевают суточную культуру бактерий рода *Bacillus* и инкубируют в термостате в течение 72 часов при температуре 37 °С.

б) Полученную культуральную жидкость центрифугируют при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут.

в) Надсадочную жидкость фильтруют с использованием стерильных **насадок на шприцы** и пропитывают полученной жидкостью фильтровальные диски диаметром 10 мм.

г) Диски накладывают на агаризованную пластинку, предварительно засеянную тест-организмом (*S.aureus*, *E.coli*, *S.enteritidis*).

д) Ведут учет результатов по наличию или отсутствию зон подавления.

Таблица 7 – Сравнительная таблица по антибиотикопродуктивности бактерий рода *Bacillus* методом наложения дисков.

Название штамма	<i>B.subtillis</i> 534	<i>B.cereus</i> IP 5832	<i>B.licheniformis</i> 31	<i>B.subtillis</i> 3
<i>S. enteritidis</i>	11,0±0,58	8,7±0,33	10,3±0,33	9,3±0,67

Заключительным этапом исследования являлось изучение повышения бактерицидного эффекта антибиотиков по средству их комбинированного использования совместно с пробиотиками. Выше изложенные методы изучения антибиотикорезистентности и антибиотикопродуктивности послужили ключом для разработки подходов к совместному применению антибиотиков и пробиотиков (таблица 8).

Чашки Петри с МПА засеяли сплошным «газоном» тест-организмом (*S. enteritidis*). Затем с помощью пробойника сделали три лунки (диаметр 6 мм) и внесли: в первую 30 мкл фильтрата, инкубированного 72 часа + 30 мкл физраствора, во вторую – 30 мкл антибиотика определенной концентрации, к которому условно-патогенные микроорганизмы оказались умеренно чувствительными + 30 мкл питательного бульона, а бактерии рода *Bacillus* – устойчивы, а в третью лунку – 30 мкл фильтрата + 30 мкл антибиотика, для того, чтобы узнать их влияние друг на друга.

Таблица 8 – Обобщающая таблица по комплексному применению антибиотиков и пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Тест-организмы	<i>S. enteritidis</i>		
	Антибиотики	Пенициллин	Цефотаксим	Хлорамфеникол
<i>B.subtillis</i> 534		Н	Н	А
<i>B.cereus</i> IP 5832		А	Н	О
<i>B.licheniformis</i> 31		А	Н	Н
<i>B.subtillis</i> 3		Н	А	О

Примечание: А – аддитивный эффект, Н – негативный эффект, О – отсутствие эффекта

Таблица 7 дает нам право выделить пару антибиотик и пробиотик, которая подавляет тест-организм *Salmonella enteritidis in vitro* и следовательно дальнейшее использование этой пары *in vivo* при лечении сальмонеллеза.

Обобщая выше сказанное следует отметить, что многоэтапный комплексный метод исследования позволяет не только сплотить коллектив студентов, занимающихся общим делом, но и позволяет им активно использовать полученные навыки на практике и при написании научных статей [2, 3].

Список литературы

1. Сизенцов, А. Н. Методы определения антибиотикопродуктивности и антибиотикорезистентности. Методические указания к лабораторному практикуму / А.Н. Сизенцов. – Оренбург. – 2009. – 107 с.

2. Абрамова Л.Л. Морфологическое обоснование эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза крыс / Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. // [Известия Оренбургского государственного аграрного университета](#). 2011. Т. 1. № 29-1. С. 192-195.

3. Абрамова Л.Л. Оценка эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза на основании исследования показателей крови / Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. // [Известия Оренбургского государственного аграрного университета](#). 2011. Т. 2. № 30-1. С. 249-253.