МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «СРЕДНЯЯ ШКОЛА № 3

УЧЕБНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОЕКТ

«Поиск потенциальных продуцентов антибактериальных веществ среди почвенных микроорганизмов. Изучение свойств выделенных метаболитов»

**Работу выполнила:**

ученица 11 «Г» класса

Голуб Мария Алексеевна

**Руководители:**

Эйдельштейн И.А. (зав. лабораторией

НИИАХ ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России),

Васильева О. И (учитель биологии)

Смоленск, 2022

**Оглавление**

**Введение 3
I. Теоретическая часть 10**1. Проблемы современной медицины 102. Антибиотики 113. Причины развития антибиотикорезистентности 174. Микроорганизмы в почве 205. Явление антагонизма 21 **II. Практическая часть 23**

**Введение**

Попытки использовать природные вещества в борьбе с микробными инфекциями предпринимались человечеством и до открытия пенициллина А. Флемингом в 1929 г. Луи Пастер в 1877 г. описал антагонистические отношения между бактериями почвы и возбудителями сибирской язвы. И.И. Мечников использовал борьбу между энтеробактериями для лечения кишечных заболеваний. В конце XIX в. П. Вайлемин (Jean Paul Vuillemin) предложил термин «антибиозис» — подавление одних микробов другими. Исследования в этой области в начале XX в. послужили толчком для поиска природных антимикробных веществ и дали начало «эре антибиотиков». Впоследствии было разработано огромное количество препаратов для борьбы с патогенными микроорганизмами (МО).

Бесконтрольное использование антибиотиков не только в клинической практике, но и в животноводстве и птицеводстве в качестве факторов роста привело к лавинообразному нарастанию количества штаммов бактерий, устойчивых к различным препаратам. За несколько последних десятилетий описано большое количество случаев приобретения устойчивости ранее чувствительными штаммами бактерий.

Исследование природных биогеоценозов для поиска новых антибактериальных препаратов представляет собой один из путей решения данной проблемы. Почва является как местом обитания антибиотикорезистентных МО и естественным источником генов устойчивости к антибиотикам, так и природной средой, в которой могут накапливаться и переноситься клинические детерминанты антибиотикоустойчивости. Являясь естественной средой обитания для огромного количества микроорганизмов и животных, почва представляет собой обширный биогеоценоз.

Способность одних МО подавлять рост других в борьбе за питательные вещества и места обитания является конкурентным преимуществом, из-за чего изучение почвенных микроорганизмов даёт обширный материал для поиска новых антибактериальных средств для использования в клинической практике.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование спектров устойчивости к природным и синтетическим антибиотикам у штаммов микроорганизмов, выделенных из лесной и газонной почвы, которая регулярно подвергается антропогенному воздействию.

**Актуальность**

Устойчивость к антибиотикам является глобальной проблемой для современной медицины и представляет угрозу для здравоохранения. Резистентность большого количества патогенных микроорганизмов к антибиотикам ставит перед исследователями амбициозные задачи поиска новых антибактериальных веществ, необходимых для борьбы с патогенами. Исследование природных биогеоценозов для поиска новых антибактериальных препаратов представляет собой один из путей решения данной проблемы.

Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов является избирательное подавление жизнедеятельности возбудителя инфекционной болезни в результате блокады метаболических процессов. Резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам представляет собой актуальную проблему для учёных на сегодняшний день вследствие возможной неэффективности использования имеющихся антимикробных препаратов для лечения пациентов с инфекциями.

С другой стороны, микроорганизмы сами способны вырабатывать антимикробные вещества, угнетающие жизнедеятельность других микроорганизмов, что может являться источником получения новых антимикробных препаратов. Антагонизм микроорганизмов широко распространён в почве, где происходит постоянная конкуренция за место и питательные вещества. Таким образом, изучение почвенных микроорганизмов представляет большой интерес в свете как изучения механизмов резистентности МО к антибиотикам, так и для поиска новых перспективных антибактериальных препаратов.

**Объект исследования:**

Два вида почв:

1. Газонная почва (зелёная полоса центральной улицы города);
2. Лесная почва

**Предмет исследования:**

Микроорганизмы, выделенные из двух образцов почв и их метаболиты.

**Цель:**

Выделение потенциальных штаммов-продуцентов антимикробных препаратов из образцов почвы города Смоленска, изучение их свойств и выделяемых метаболитов.

**Задачи:**

1. Изучение научной литературы, связанной с механизмами резистентности микроорганизмов;

2. Изыскание и сбор двух образцов почв для исследования в лаборатории;

3. Получение чистой культуры микроорганизмов из образцов почвы;

4. Определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов;

5. Выявление фенотипической устойчивости выделенных микроорганизмов к различным антибактериальным препаратам;

6. Изучение свойств продуцируемых микроорганизмами метаболитов;

7. Изучение синергетического эффекта между двумя антибактериальными препаратами.

**Гипотеза**

Почва леса и газона отличаются по видовому составу, а спектр устойчивости микроорганизмов, выделенных из них, зависит от систематической принадлежности данного штамма и места его обитания. Кроме того, почвенные микроорганизмы сами способны продуцировать биологически активные продукты, в результате чего почва представляет собой обширный материал для поиска новых антимикробных препаратов.

**Методы исследования**

**Теоретические:**

1. Аналитические (анализ, синтез, сравнение);

2. Изучение научной литературы;

3. Подготовка и планирование эксперимента;

**Практические:**

1. Сбор двух видов почвы (лесная и почва городского газона);

2. Приготовление последовательных десятикратных разведений для каждого вида почвы (-1,-2,-3,-4);

3. Посев «газоном» 100 µl суспензии на селективные чашки Muller-Hinton агаром, содержащие антибиотики:

 1. Ampicillin (8 µg/ml),

 2. Colistin (2 µg/ml),

 3. Tetracycline (0,5 µg/ml),

 4. Chloramphenicol (8 µg/ml).

4. Культивирование в термостате 24 часа при 35°C;

5. Характеристика и отбор штаммов с определенной морфологией колоний;

6. Определение видовой принадлежности МО-продуцента с использованием MALDI-TOF спектрометрии;

7. Исследование антагонистических свойств с использованием тест-культур
с различными свойствами:

 1. *P. aeruginosa* ATCC 27853

 2. *A. baumanii* 128179

 3. *S. aureus* ATCC 25922

 4. *S. marcescens* 128123

 5. *E. coli* ATCC 25922

 6. *E. coli* ATCC 35218

 7. *K. pneumoniae* ATCC 700603

8. Отбор перспективных продуцентов

9. Характеристика антимикробных свойств продуцентов с использованием дисков с антибиотиками (µg/ml) для подавления сопутствующей флоры:

1. Ciprofloxacin 5
2. Cefepime 30
3. Ceftazidime 10
4. Meropenem 10
5. Piperacillin/tazobactam 30/6

6.Trimethoprim/sulphamethoxazole 1,25/23,75
7. Tetracycline 30
8. Gentamicin 10
9. Cefotaxime 5

10. Amoxicillin/clavulanic acid 20/10

**Материалы**

1. Два образца почвы (газона и лесная);

2. Чашки Петри с разными видами добавленного антибиотика;

3. Пробирки со стерильным физиологическим раствором;

4. Петли инокуляционные;

5. Тест-культуры с различными свойствами;

6. Диски с антибиотиками

**Ресурсы**

1. Временные – проект выполнялся в течение 3 месяцев (февраль 2022 г.- апрель 2022 г.);

2. Информационные – научная литература, сеть Интернет;

3. Материально-технические – компьютер, принтер, лабораторное оборудование (чашки Петри, пробирки, петли инокуляционные, диски с антибиотиками, тест-культуры);

4. Интеллектуальные – консультации руководителей проекта.

**Этапы работы**

1. Подбор и изучение литературы по данной проблеме (февраль-март 2022 г.);

2. Подготовка и проведение исследования, обработка результатов (февраль - март 2022 г.);

3. Оформление работы и подготовка научно-исследовательского проекта

 и презентации к защите (март – апрель 2022 г.).

**Практическая значимость**

Информация и опыты, приведённые в рамках данной научно-исследовательской работы, будут полезны исследователям, заинтересованным в изучении механизмов развития резистентности и для поиска новых перспективных антимикробных препаратов в естественных биогеоценозах.

**Теоретическая часть**

1. **Проблемы современной медицины**

Прошедший век стал благоприятным для медицины в связи с изучением и открытием ряда антибиотиков, широко применяемых в клинической практике для лечения бактериальных инфекций. Эти открытия сильно повлияли на качество жизни людей, сильно изменив их жизнь к лучшему. Однако, бесконтрольное применение антибактериальных препаратов в чрезмерно больших количествах среди населения по всему миру привело к тому, что сегодня человечество вступило в эру антибиотикорезистентности, когда многие патогенные микроорганизмы становятся нечувствительными к воздействию на них антибиотиков. При воздействии на микроорганизм антибактериального препарата для подавления его развития и, как следствие, размножения, патоген не подвергается воздействию на него лекарства и продолжает жизнедеятельность, из-за чего инфекция не завершается, а продолжает прогрессировать.

Более 50% антибиотиков применяются не только в медицинских целях, но и в промышленной деятельности человека. Таким образом резистентные штаммы обнаруживаются не только в больничных палатах, но и в почве, куда поступают продукты жизнедеятельности макроорганизмов, возможно содержащие остатки антибактериальных препаратов, их производные и другие метаболиты. Помимо этого, антибиотики используются для повышения показателей эффективности животноводства, что способствует их попаданию в почву. Ненадлежащее применение антибиотиков в животноводстве является основополагающим фактором, способствующим появлению и повсеместному распространению резистентных микроорганизмов. Попав в почву, микроорганизмы начинают расселяться и размножаться, что приводит к множественному распространению резистентных штаммов в природе.

Одной из важнейших задач на сегодняшний день стало изучение вопросов, связанных с антибиотикорезистентностью и решением ряда проблем, возникших из-за множественного привыкания микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Эта серьёзная проблема уже не представляет собой лишь прогноз на будущее, поскольку она уже проявляется прямо сейчас в каждом регионе мира и может отрицательно сказаться на каждом из нас. Устойчивость к антибиотикам — одна из серьёзнейших угроз для здоровья людей вследствие отсутствия всякого влияния на патоген со стороны антибактериальных препаратов. В этой связи лечение становится продолжительнее и протекает тяжелее из-за отсутствия всякого воздействия на патоген ингибитором.

Основными причинами возникновения устойчивости к противомикробным препаратам являются неправильное и чрезмерное применение антимикробных препаратов, неудовлетворительная профилактика инфекций и инфекционный контроль в медицинских учреждениях и на сельскохозяйственных предприятиях, низкий уровень осведомлённости и знаний людей о применении антибактериальных препаратов.

Одним из путей решения данной проблемы является поиск новых штаммов микроорганизмов, изъятие их из биогеоценоза и изучение свойств выделяемых ими метаболитов в лабораториях с целью получения нового антибактериального препарата, к которому не будет наблюдаться множественная устойчивость у патогенов.

1. **Антибиотики**

**Антибиотики** - это вещества, продуцируемые живыми существами
(в основном микроорганизмами) и обладающие противомикробным действием.

Антибиотики, будучи противобактериальными препаратами, бесполезны для лечения заболеваний, имеющих вирусную природу. Антибиотики на вирусы не действуют.

Антибиотики действуют избирательно, подавляя только определенные виды микробов. Для каждого антибиотика характерен свой набор подавляемых микробов или, иначе говоря, свой антимикробный спектр действия. Механизм действия антибиотиков заключается в подавлении определенных процессов в обмене веществ микробной клетки: процессов питания, дыхания, размножения.

Антибиотики подразделяются на группы в соответствии, как правило, с химической структурой (бета-лактамы, макролиды, аминогликозиды и др). Наличие высокой активности и низкой токсичности позволяет успешно использовать антибиотики в качестве средств для лечения различных инфекционных и опухолевых заболеваний.

Огромное разнообразие антибиотиков и видов их воздействия на организм человека явилось причиной классифицирования и разделения противомикробных препаратов на группы. По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики можно разделить на две группы:

* бактериостатические (бактерии остаются живы, но не в состоянии размножаться),
* бактерицидные (бактерии погибают, а затем выводятся из организма).

Классификация по химической структуре, которую широко используют в медицинской среде, состоит из следующих ключевых групп:

**Бета-лактамы** (объединяет наличие в структуре β-лактамного кольца) обладают бактерицидным эффектом. Мишень их действия – пенициллиносвязывающие белки бактерий, которые выполняют роль ферментов на завершающем этапе синтеза клеточной стенки бактерий. Токсичность в отношении макроорганизма для β-лактамов нехарактерна.

К бета-лактамам относятся три подгруппы:

* Пенициллины — вырабатываются колониями плесневого грибка Penicillinum; родоначальником пенициллинов является бензилпенициллин. Большинство анаэробных бактерий чувствительны к природным пенициллинам. Приобретённая резистентность к природным пенициллинам чаще всего встречается среду стафилококков;
* Цефалоспорины — обладают высокой эффективностью и низкой токсичностью. Выделяют четыре поколения. Оказывают бактерицидное действие, которое связано с нарушением образования клеточной стенки бактерий. Основными особенностями цефалоспоринов по сравнению с пенициллинами являются их большая резистентность по отношению к β-лактамазам — ферментам, вырабатываемым микроорганизмами, используются по отношению к пенициллинустойчивым бактериям;
* Карбапенемы по сравнению с пенициллинами и цефалоспоринами более устойчивы к гидролизующему действию β-лактамаз и обладают более широким спектром активности. Оказывают мощное бактерицидное действие, останавливая синтез клеточной стенки. Способны быстрее проникать через наружную мембрану.
* Монобактамы обладают бактерицидным эффектом, который связан с нарушением образования клеточной стенки бактерий. Своеобразие антимикробного спектра действия обусловлено устойчивостью ко многим β-лактамазам.

Представители: ампициллин, амоксициллин, пиперациллин и др.

Сходство химической структуры предопределяет одинаковый механизм действия всех β-лактамов (нарушение синтеза клеточной стенки бактерий), а также перекрёстную аллергию к ним у некоторых пациентов в процессе использования.

Составляют основу современной химиотерапии, так как занимают главенствующее место в лечении большинства инфекций, среди них: синусит, острый цистит, инфекции кожи и мягких тканей.

**Аминогликозиды** являются одним из ранних классов антибиотиков и до сих пор остаются незаменимыми при лечении ряда инфекций. Оказывают бактерицидное действие, которое связано с нарушением синтеза белка рибосомами. Уровень антибактериальной активности аминогликозидов зависит от их максимальной (пиковой) концентрации в сыворотке крови.

Представители: стрептомицин, гентамицин

Основное клиническое значение аминогликозиды имеют при лечении нозокомиальных инфекций, вызванных аэробными возбудителями. Стрептомицин используют при лечении туберкулёза.

**Хинолоны/фторхинолоны** по механизму действия принципиально отличаются от других АМП (антимикробных препаратов), что обеспечивает их активность в отношении устойчивых клинических штаммов МО. Оказывают бактерицидный эффект, нарушая синтез ДНК и процесс репликации бактериальной клетки. Хорошо проникают в клетку и не подвергаются внутриклеточной трансформации.

Представители: ципрофлоксацин, лемофлоксацин и др.

Часто используют для лечения инфекций мочевыводящих путей, а также их обострённые формы (обострённый пиелонефрит).

**Тетрациклины** обладают бактериостатическим эффектом, который связан с нарушением синтеза белка в клетке. Обладают широким спектром антимикробной активности, однако в процессе многолетнего использования многие бактерии приобрели к ним резистентность.

Представители: тетрациклин, доксициллин и др.

Используют для лечения инфекций дыхательных и мочевыводящих путей; бактериальных, хламидийных инфекций и угревой сыпи.

**Полимиксины** являются циклическими полипептидами, синтезируемыми спорообразующей палочкой *Bacillus polymixa*. Характеризуются узким спектром активности и высокой токсичностью. Обладают уникальным механизмом бактерицидного действия, основанном на нарушении структуры наружной клеточной мембраны бактерий за счёт вытеснения катионов кальция и магния из образующих её липополисахаридов, что приводит к дестабилизации и повышению проницаемости мембраны и последующей гибели микробной клетки.

Представители: полимиксин В, полимиксин М и др.

Используют при лечении тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний(сепсис, менингит, пневмония), вызванных микроорганизмами с множественной устойчивостью к другим антибиотикам, а также при инфекциях кожи и мягких тканей.

**Сульфаниламиды** обладают бактериостатическим эффектом.Ингибируют бактериальный фермент, ответственный за синтез дигидрофолиевой кислоты (важнейший фактор жизнедеятельности МО). Некоторые препараты содержат серебро, в результате диссоциации ионы которого медленно высвобождаются, оказывая бактерицидное действие (за счёт связывания с ДНК).

Представители: сульфаниламид, сульфасалазин и др.

Применяют при лечении инфекций кожи, дыхательных путей, ЛОР-органов, мочевыводящих путей, раневых инфекций.

**Макролиды** — антибиотики со сложной циклической структурой, основой которой является макроциклическое 14- или 16-членное лактонное кольцо. Действие — бактериостатическое, обусловлено нарушением синтеза белка на рибосомах микроорганизмов. Многие макролиды помимо антимикробной активности оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее и мукорегулирующее действия. Относятся к числу наименее токсичных антибиотиков.

Представители: эритромицин, эритромициламин, кларитромицин и др.

Являются препаратами первого выбора при внебольничных пневмониях и обострении хронического гнойно-обструктивного бронхита.

**Гликопептидные антибиотики** продуцируются различными представителями почвенных актиномицетов. Ингибируют синтез клеточных стенок бактерий, оказывая бактерицидное действие.

Представители: ванкомицин, тейкопланин и др.

Широко используют для лечения нозокомиальных инфекций.

Кроме лечения инфекционных заболеваний человека и животных, в настоящее время антибиотики находят широкое применение:

1. для стимуляции роста и продуктивности животных;
2. для профилактики отдельных массовых бактериальных и грибковых заболеваний растений и животных;
3. для консервирования различных пищевых продуктов.

Среди общественности широко распространено непонимание принципов работы антибиотиков. Неправильный приём антибиотиков, использование антибактериальных препаратов без необходимости и назначений врача сильно увеличивает опасность распространения устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Кроме того, активное и чрезмерное использование в сельскохозяйственной деятельности привело к распространению устойчивых форм МО в почве и водоёмах.

1. **Причины развития антибиотикорезистентности**

**Антибио́тикорезисте́нтность** — это частный случай устойчивости к противомикробным препаратам, когда микроорганизмы становятся устойчивыми к антибиотикам.

Резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам может быть либо врождённой (природной), либо приобретённой

* Истинная природная устойчивость является постоянным видовым признаком и характерна для подавляющего большинства штаммов определённого вида или группы микроорганизмов. Природная резистентность обычно связана с отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или низким сродством к имеющейся мишени, а также недоступностью мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. В случае природной резистентности клиническая неэффективность антибиотика является легко прогнозируемой на основании данных видовой идентификации микроорганизма.
* Под приобретённой устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретённую устойчивость. Появление у бактерий приобретённой резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика.

Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически. Резистентность к антимикробным препаратам проявляется, когда микроб эволюционирует с целью становления более или полностью устойчивым к противомикробным препаратам, которыми ранее на него можно было воздействовать с целью подавления его жизнедеятельности или угнетением его свойств. Резистентность может появляться спонтанно вследствие произвольных мутаций, однако чаще всего она проявляется со временем в результате привыкания микроорганизма к антимикробному препарату. Воздействие на резистентные патогены становится все более затруднённым и требует использования альтернативных лекарственных препаратов или более высоких доз.

Существует несколько биохимических механизмов устойчивости к антимикробным препаратам:

*Ферментная инактивация*

Наиболее распространённый механизм устойчивости микроорганизмов., происходит выработка клеткой специфических ферментов, расщепляющих антибиотик до момента его воздействия на клетку. К настоящему времени описано более 500 ферментов, различающихся по своим практическим свойствам.

*Снижение проницаемости внешних структур*

Внутренняя мембрана является препятствием для проникновения препарата внутрь клетки, благодаря нарушению проницаемости клетки, антибиотик не может проникнуть в неё для подавления жизнедеятельности. Так как транспорт антибиотика через внешнюю мембрану осуществляется через каналы, образованные особыми белками – поринами, в результате мутаций возможна полная или частичная утрата поринов, приводящая к выраженному в различной степени снижению чувствительности к препаратам. Данный механизм, как правило, встречается в сочетании с другими механизмами.

*Активное выведение из микробной клетки*

Активация бактерией клеточных систем, выводящих антибиотик из клетки в окружающую среду, подавляют возможность воздействия препарата на патоген. Эффлюкс системы играют ключевую роль в клинически значимой устойчивости к антибактериальным препаратам. Они катализируют активный отток широкого спектра антибактериальных препаратов, включая химиотерапевтические вещества.

*Модификация мишени действия*

 Данный тип устойчивости связан с изменением структуры молекулы-мишени, с которой связывается антибиотик. Данный тип устойчивости может быть обусловлен возникновением спонтанных генных мутаций, приводящих к структурным изменениям кодируемых им молекул-мишеней, нарушающими связывание с антибиотиком, и стабилизацией таких мутаций в присутствии антибиотиков. Другой способ устойчивости обусловлен наличием генов, которые могут передаваться с помощью горизонтального переноса. Продукты этих генов модифицируют молекулу-мишень. В этом случае в результате модификации мишени процесс связывания с ней антибиотика либо частично, либо полностью нарушается.

*Образование метаболического шунта*

 Бактерия разрабатывает методы инактивации антибиотика, что способствует появлению механизмов выведения антибиотика за пределы бактериальной клетки. Образуется так называемый «метаболический шунт», или обходной путь.

 Приобретённая устойчивость микроорганизмом передаётся по наследству. Поэтому в настоящее время перед лечением антибиотиками необходимо проверить, к какому антибиотику возбудитель заболевания нечувствителен. Для этого в лаборатории делают сплошной посев микроба на поверхность агаровой питательной среды и в разных местах кладут на посев диски фильтровальной бумаги, пропитанные различными антибиотиками. Нечувствительные микробы дадут рост непосредственно вокруг диска, а чувствительные микробы дадут рост только в некотором отдалении от диска, вблизи же диска рост будет задержан.

1. **Микроорганизмы в почве**

Микроорганизмы обитают практически везде. Их можно встретить в любых уголках нашей планеты — от глубин океана до верхних слоёв атмосферы. Подавляющая часть всех микроорганизмов, обитающих на планете Земля, сосредоточено в почве. Такое разнообразие связано с тем, что помимо микроорганизмов в ней обитают также одноклеточные грибки, дрожжи, живут простейшие и некоторые животные, которые выделают в неё продукты своей жизнедеятельности (в 1 г почвы насчитывается до 6 млрд микробных тел). В почвенной среде располагаются корни растений, из-за того, что большинство микроорганизмов — гетеротрофы, для питания им необходимы готовые органические вещества, которые синтезируются растениями за счёт фотосинтеза и постоянно выделяются через корни, давая микроорганизмам необходимые для жизни питательные вещества. Помимо этого, в почве не наблюдается резких перепадов температур, то есть климат и условия для жизни благоприятно сказываются на росте и существовании микроорганизмов. Эти факторы влияют на то, что почва становится благоприятным местом для жизнедеятельности микроорганизмов.

В почву вносят всевозможные удобрения, что также способствует расселению микроорганизмов в этой среде. В результате, хотя почва занимает меньшую часть поверхности нашей планеты, она является самым густонаселённым микроорганизмами местом. На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет её тип, плодородие, влажность и деятельность человека: обработка почвы, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств.

Микроорганизмы в почве осуществляют множество различных биохимических реакций, потребляют одни вещества, синтезируют другие. Благодаря такому высокому разнообразию, высокой численности населяющих эту среду микроорганизмов, почва превращается в мощнейшую биохимическую систему, которая пропускает через себя значительные потоки вещества и энергии. Кроме того, почвенные микробные сообщества важны для человека ввиду поиска новых видов микроорганизмов для биотехнологии, а с недавнего времени и источником новых генов для генной инженерии. Почва исследуется, главным образом, с целью выявления и синтеза новых антибиотиков для применения в клинической практике.

1. **Явление антагонизма**

**Антагонизм микроорганизмов** — тип несимбиотических взаимоотношений микроорганизмов, при котором один штамм полностью подавляет или замедляет рост другого. Может наблюдаться как в естественных условиях, так и в лабораторных. Микроорганизмы-антагонисты могут относиться к любым таксономическим группам.

Основными продуцентами антибиотиков служат микроорганизмы, обитающие в почве и воде, где они постоянно вступают между собой в самые разнообразные взаимоотношения. Последние могут быть нейтральными, взаимовыгодными, чаще всего они являются антагонистическими. Только при наличии антагонизма в природе могло сложиться сбалансированное сосуществование громадного числа видов живых существ. Антагонистические взаимоотношения между бактериями наблюдал Л. Пастер. И. И. Мечников предложил использовать антагонизм между бактериями на пользу человеку.

Некоторые виды микроорганизмов продуцируют определенные вещества в ходе своей жизнедеятельности. Свойства данных веществ заключается в угнетении роста и развития микроорганизмов других видов, в том числе и патогенных. Данные вещества развились в процессе эволюции как средство борьбы против других микроорганизмов с целью выживания. Такие вещества называются антибиотиками. Микроорганизмы, вырабатывающие антимикробные вещества обладают конкурентным преимуществом в борьбе за существование. В настоящее время они широко применяются в борьбе с инфекционными заболеваниями человека, животных и растений. Открытие и использование антибиотических веществ явилось одним из самых блестящих достижений микробиологии и медицины двадцатого века.

Наибольшее количество антагонистов-микробов сосредоточено именно в почве. Чем больше заселена почва микроорганизмами, тем острее между ними идёт конкуренция за существование и питательные вещества и тем чаще в ней встречаются микробы-антагонисты, вырабатывающие определённые вещества для угнетения роста других микроорганизмов.

Стоит отметить, что именно чрезмерное применение антибиотиков привело к усилению антибиотикорезистентности, что является глобальной угрозой для здравоохранения ввиду неэффективности препаратов. В борьбе за жизнь болезнетворные микробы начинают приспосабливаться к воздействию антибиотиков, привыкают к ним, получают способность переносить всевозрастающие их дозы.

В настоящее время учёные проводят постоянные исследования по изысканию новых антимикробных препаратов. Научная работа включает в себя обширные поиски новых антибиотиков, более совершенных, к которым микробы не имеют устойчивости. Для этого выделяют из почвы и других источников новые культуры микроорганизмов, изучая их антагонистические свойства. В настоящее время учение об антибиотиках вылилось в огромную и важную область прикладной микробиологии с мощной производственной базой для изготовления различных биопрепаратов и с многочисленными кадрами исследователей.

**II. Практическая часть**

Для выявления отличий между двумя видами почв, а также для выделения потенциально устойчивых штаммов микроорганизмов для последующего проведения теста на антагонизм, мы провели эксперимент, который заключался в том, что:

1. Собрали два вида почвы, после чего приготовили четыре последовательных десятикратных разведений для каждого вида 1 g почвы (-1,-2,-3,-4), 0 пробирка - 1 g почвы растворили в 5 мл стерильного физраствора;
2. Сделали «газонный» посев для 100 µl суспензии на селективные чашки с Muller-Hinton агаром, содержащие антибиотики для подавления сопутствующей флоры :

 1. Ampicillin (8 µg/ml),

 2. Colistin (2 µg/ml),

 3. Tetracycline (0,5 µg/ml),

 4. Chloramphenicol (8 µg/ml);

1. Отправили чашки культивироваться в термостат на 24 часа при 35°C;

На следующий день при просмотре чашек с почвой газона мы обнаружили, что:

* На чашках c добавлением антибиотиков Tetracycline и Chloramphenicol не выявлено ни одной колонии МО;
* Чашка с Ampicillin:

*Bacillus mycoides, Bacillus cereus*

* Чашка с Colistin:

*Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium*

* На чашке без добавления антибиотика (контроль) обнаружено:

*Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus*

* Морфология выделенных колоний разнообразна, например *Bacillus cereus* напоминает вату;
* микробный пейзаж не зависит от селективных добавок.

При оценке микробного пейзажа почвы леса обнаружено:

* Степень обсеменения на чашках с лесной почвой больше, в сравнении с почвой газона;
* Чашки с разведениями почвы -3, -4 не дают видимого роста МО ввиду низкой концентрации микробной взвеси;
* Чашка с Ampicillin:
*Paenibacillus lautus, Paenibacillus murolis, Micrococcus luteus*
* Чашка с Colistin:
*Aeromonas encheleia, Peribacillus muralis*
* На чашке без добавления антибиотика обнаружено:
*Aeromonas encheleia, Peribacillus muralis, Paenibacillus lautus*
* Микробный пейзаж почвы, собранной с лесного массива и почвы, собранной с газона, отличается по видовому составу

Колонии, выросшие на чашках с селективными добавками антибиотиков, преимущественно отбирались для проверки антагонистических свойств, как потенциально имеющие механизмы защиты. Было проверено 14 штаммов потенциальных продуцентов на возможность синтеза антибактериальных веществ. Задержку роста тест-культур оценивали через 48 часов после суточного накопления в среде метаболитов. Потенциальные продуценты, полученные в ходе оценки микробного пейзажа двух видов почв, были отобраны для дальнейшего изучения.

**Результаты исследования. Определение антагонистической активности и отбор продуцентов**

Для исследования антагонистических свойств было выбрано 7 тест-культур, отличающихся по своим свойствам.

Из 14 штаммов только 2 продемонстрировали антагонистичекую активность в отношении тест культур:

1. Частичное угнетение роста культуры (*E. coli* ATCC 35218 и *S. aureus* ATCC 25922) вблизи роста продуцента выявлено у *B. mycoides* и *B. subtilis;*
2. Ни одна из культур лесной почвы не продемонстрировала антагонистической активности, продуцентов не найдено;
3. Культуры *B. mycoides* и *B. Subtilis* выбраны для дальнейшего исследования как потенциальные продуценты антимикробных веществ

Данные культуры выбраны для дальнейших исследований как потенциальные продуценты антибиотиков.

Характеристика антимикробных свойств продуцентов проводилась с использованием дисков с антибиотиками (10 штук), отличающихся по своим свойствам.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Диски с антибиотиками** | ***B. subtilis* (мм)** | ***B. mycoides* (мм)** |
| Cefepime 30 | 30 | 6 |
| Ceftazidime 10 | 10 | 6 |
| Cefotaxime 5 | 10 | 6 |
| Amoxicillin/clavilanic acid 20/10 | 30 | 6 |
| Piperacillin/tazobactam 30/6 | 30 | 20 |
| Meropenem 10 | 30 | 30 |
| Trimethoprim/sulphamethoxazde 1,25/23,75 | 30 | 22 |
| Tetracycline 30 | 20 | 27 |
| Gentamicin 10 | 25 | 30 |
| Ciprofloxacin 5 | 30 | 30 |

**Выводы по результатам экспериментов:**

1. Два вида почв различаются по видовому составу;
2. Бациллярные формы МО преобладают в почве газона (*Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus mycoides*);
3. Количество изолированных колоний, выявленных на чашках с лесной почвой выше, чем на чашках с почвой газона;
4. Частичное угнетение роста культуры (*E. coli* ATCC 35218 и *S. aureus* ATCC 25922) вблизи роста продуцента выявлено у *B. mycoides и B. subtilis;*
5. Разные антибактериальные препараты разных групп демонстрируют различную активность в отношении *B. mycoides* и *B. subtilis*;
6. *B. mycoides* устойчив к β-лактамным антибиотикам;
7. *B. subtilis* растёт на среде Colistin 4;
8. Синергетический эффект был выявлен между антибиотиками:
	1. Gentamicin 10 и Piperacillin/tazobactam 30/6
	2. Ceftazidime 10 и Trimethoprim/sulphamethoxazde 1,25/23,75;
9. *B. mycoides* и *B. subtilis* депонированы в музей НИИАХ для дальнейших исследований;
10. Выявлены штаммы, обладающие устойчивостью к более чем одному из использовавшихся антибиотиков.