

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский Национальный исследовательский технический университет
имени К.И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»

Ахметова Айым Берікқызы

«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии
Pseudomonas aeruginosa»

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Специальность 5В070100 – «Биотехнология»

Алматы 2019

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский Национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»



ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам
бактерии *Pseudomonas aeruginosa*»

по специальности 5В070100 – «Биотехнология»

Выполнила

Ахметова Айым Берікқызы

Научные руководители:
канд. с.-х. наук, доцент, ассоц.
профессор
Джамалова Г.А.
« 06 » « 05 » 2019 г.

Магистр ветеринар. наук,
ветеринарный врач-микробиолог
лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ»
Безрукова А.Н.
« 06 » « 05 » 2019 г.

Алматы 2019

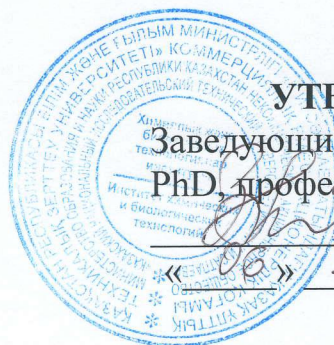
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский Национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»

Специальность 5В070100 – «Биотехнология»



УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой «БТ»

PhD, профессор

Туйебахова З.К.

2019 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломной работы

Обучающемуся *Ахметова Айым Берікқызы*

Тема: «Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии *Pseudomonas aeruginosa*»

Утверждена приказом Ректора Университета №1163-б «16» 10.2019 г.

Срок сдачи законченной работы «13» 05.2019 г.

Исходные данные к дипломной работе: бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из промышленного птицеводческого объекта

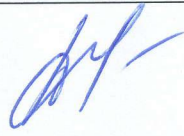
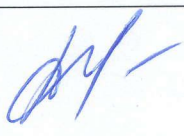
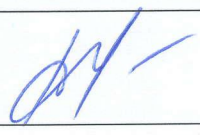
Краткое содержание дипломной работы:

- а) аналитический обзор литературы;
- б) объект, материалы и методы исследования;
- в) результаты исследования.

Перечень графического материала: представлены 7 слайдов презентации работы.

Рекомендуемая основная литература: из 18 наименований

ГРАФИК
подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Аналитический обзор литературы	25.02.2019 г.	
Объект, материалы и методика исследования	17.03.2019 г.	
Результаты исследования	01.04.2019 г.	

Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов работы

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Аналитический обзор литературы	Г.А. Джамалова канд. с.-х. наук, ассоц. профессор	06.05.2019	
Объект, материалы и методика исследования	Г.А. Джамалова канд. с.-х. наук, ассоц. профессор Безрукова А.Н. маг.вет.наук, ветеринарный врач-микробиолог лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ»	06.05.2019	 
Результаты исследования	Г.А. Джамалова канд. с.-х. наук, ассоц. профессор Безрукова А.Н. маг.вет.наук, ветеринарный врач-микробиолог лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ»	06.05.2019	 
Нормоконтролер	А.Ж. Абильдаева магистр наук	06.05.2019	

Научный руководитель



Джамалова Г.А.

Задание принял к исполнению обучающийся



Ахметова А.Б.

Дата

« 06 » 05 2019 г.

АННОТАЦИЯ

Ключевые слова. Культивирование микроорганизмов, бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам.

Структура и объем дипломной работы. Текст дипломной работы изложен на 31 страницах. По структуре диплом включает введение (1 стр.), три раздела (теоретические исследования изложены на 5 страницах, полевые и лабораторные исследования на 14 страницах и заключение на 1 странице.

В дипломной работе имеется библиографический список литературы, включающий 18 наименований. В тексте диплома содержится 9 рисунков и 2 таблицы.

Объект исследования. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Предмет изучения. Изучение чувствительности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

Цель работы. Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Полученные результаты. Проведен мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Изучены ключевые биологические свойства бактерий *Pseudomonas aeruginosa*: оптимальная температура роста при 24 часов культивирования составляет 27-30 °С. Выявленные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* по результатам исследований отнесены к категории высокой (Oxytetracyclin, Colistin) и слабой (Morbofloxacin, Doxycycline, Sulfamenmoxazole / Trimethoprim) чувствительности.

АНДАТПА

Түйін сөздер: Микроорганизмдерді өсіруі, *Pseudomonas aeruginosa* бактериялар, бактериялардың антимикробтық сезімталдығы.

Дипломдық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Дипломдық жұмыстың мәтіні 31 бетте көрсетілген. Дипломның құрылымына кіріспе (1 бет), үш бөлім (теориялық зерттеулер 5 бетте көрсетілген, далалық пен зертханалық зерттеулер 14 бетте және қорытынды 1 бетте көрсетілген).

Дипломдық жұмыста 18 атаудан тұратын библиографиялық әдебиттер тізімі бар. Дипломдың мәтіні 9 сүреттен және 2 кестеден тұрады.

Зерттеу объектісі: *Pseudomonas aeruginosa* түріндегі бактериялар

Зерттеу пәні: *Pseudomonas aeruginosa* түріндегі бактериялардың антимикробтық сезімталдығын зерттеу.

Жұмыстың мақсаты. *Pseudomonas aeruginosa* түріндегі бактериялардың антимикробтық сезімталдығын бақылау.

Бақылау нәтижелері. *Pseudomonas aeruginosa* түріндегі бактериялардың антимикробтық сезімталдығын бақылауы өткізілді. *Pseudomonas aeruginosa* бактериялардың негізгі биологиялық қасиеттері зерттелді: 24-сағаттық өсіруінде оңтайлы өсу температурасы 27-30 °C құрайды. Анықталған *Pseudomonas aeruginosa* бактериялар зерттеу нәтижесінде жоғарғы (Oxytetracyclin, Colistin) және төменгі (Morboflaxycin, Doxycyclin, Sulfamenmoxazole / Trimethoprim) санаттарға бөлінген.

ANNOTATION

Keywords. Cultivation of microorganisms, bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria sensitivity to antibacterial drugs.

The structure and scope of the thesis. Thesis text is presented on 31 pages. The structure of the diploma includes an introduction (1 page), three sections (theoretical studies are presented on five pages, field and laboratory studies on 14 pages and conclusion on one page).

The thesis work has a bibliographic list of references, including 18 titles. The text of the diploma contains nine drawings and two tables.

Object of study. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

The subject of study. The study of the sensitivity of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial drugs.

Objective. Monitoring the sensitivity to antibacterial drugs bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Results. The sensitivity to antibacterial drugs *Pseudomonas aeruginosa* was monitored.

The key biological properties of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* were studied: the optimum growth temperature at 24 hours of cultivation is 27-30 °C. The identified bacteria *Pseudomonas aeruginosa* according to the results of research are classified as high (Oxytetracycline, Colistin) and weak (Marbofloxacin, Doxycycline, Sulfamethoxazole / Trimethoprim) sensitivity.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	9
1	Аналитический обзор литературы	10
1.1	Экология <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2	Биология <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.3	Культуральные свойства бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	14
2	Объект и методы исследования	16
2.1	Объект и предмет изучения	16
2.2	Материалы исследования	17
2.3	Методы исследования	21
3	Результаты исследования	23
3.1	Отбор смывов	23
3.2	Культивирование и количественный учет микроорганизмов	23
3.3	Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии рода <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
	Заключение	29
	Список использованной литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. С развитием технологии производства антибиотиков, к нашему сожалению, происходит развитие антибиотикорезистентности у бактерий. Это, в свою очередь, сказывается на увеличении экономических затрат, связанных с мониторингом промышленных птицеводческих объектов.

Объект исследования. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Предмет изучения. Изучение чувствительности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

Цель работы. Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Задачи:

- изучение биологических свойств бактерий *Pseudomonas aeruginosa*;
- освоение методики по изучению культуральных свойств бактерий *Pseudomonas aeruginosa*;
- мониторинг по распространению бактерий *Pseudomonas aeruginosa* на отдельном птицеводческом объекте.

Практическое значение. В процессе работы над дипломом в условиях научно-диагностической лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ» изучены микробиологические методы исследования: метод отбора смывов согласно межгосударственного стандарта ГОСТ 7702.2.0-2016 [1], микробиологический метод исследования [2].

Достоверность полученных результатов подтверждается в исследованиях:

- применением, утвержденных в РК, действующих методик;
- воспроизводимостью работы.

Личный вклад автора в работу:

- 1) теоретические исследования по изучению биологических и культуральных свойств бактерий *Pseudomonas aeruginosa*;
- 2) полевые и лабораторные исследования;
- 3) анализ работ по результатам проведенных исследований.

Структура и объем дипломной работы. Текст дипломной работы изложен на 30 страницах. По структуре диплом включает введение (1 стр.), три раздела (теоретические исследования изложены на 5 страницах, полевые и лабораторные исследования на 11 страницах и заключение на 1 странице).

В дипломной работе имеется библиографический список литературы, включающий 18 наименований. В тексте диплома содержится 9 рисунков и 2 таблицы.

1 Аналитический обзор литературы

1.1 Экология *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Экология *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa:

- 1) обладают нейтробельностью к питательным веществам и поэтому их можно обнаружить повсеместно;
- 2) являются константными обитателями почвы, воды и воздушного бассейна [3].

Как известно, состав (количественный и качественный) микробиоценоза в окружающей среде определяется:

- 1) содержанием в них:
 - питательных веществ органической природы;
 - питательных неорганических веществ;
- 2) времени года;
- 3) метеоусловий;
- 4) заселенности;
- 5) уровня развития техногенеза (уровня урбанизации).

1.1.2 Распространение *Pseudomonas aeruginosa* в воде [4]

Постоянными обитателями пресной воды являются:

- 1) бактерии рода *Pseudomonas*;
- 2) бактерии рода *Micrococcus*;
- 3) бактерии рода *Sarcina*;
- 4) некоторые виды *Spirochaetae*;
- 5) бактерии рода *Aquaspirillum*;
- 6) бактерии рода *Vibrio*;
- 7) бактерии рода *Aeromonas*;
- 8) реже встречаются бациллы.

С учетом роли водной сферы для живой природы и антропогенной деятельности человека, следует учитывать воздействие патогенных и условно патогенных форм микроорганизмов, которые интегрируются в среду и быстро размножаются и распространяются в различные объекты окружающей среды через воду.

Сточные воды (стоки) урбанизированной канализации содержат в 1 мл миллиарды (несколько миллиардов) микробных клеток. При такой плотности (густо заселённости) микроорганизмов в сточных водах (стоках) повышается вероятность присутствия условно патогенных и патогенных форм микроорганизмов – возбудителей различных болезней.

1.1.3 Распространение *Pseudomonas aeruginosa* в почве

Почва, как депо, служит средой обитания для многочисленных родов и видов микроорганизмов.

Количественный состав микроорганизмов в 1 г почвы фиксируется на уровне сотни и тысяча миллионов клеток и варьируют от 200 млн (например, глинистая почва) до 5 млрд (например, чернозем).

Количественный и качественный состав микроорганизмов в почве зависит от:

- 1) содержания в ней питательных веществ и влаги;
- 2) морфологической структуры почвы;
- 3) промышленного назначения региона;
- 4) климатических и географических условий;
- 5) качества растительного покрова;
- 6) степени загрязнения почвы отходами производства и потребления;
- 7) других факторов.

В превращении органических веществ (в биологическом круговороте), которые поступают в почву и образуются в ней, принимают участие различные сообщества, роды и виды микроорганизмов:

- 1) гнилостные;
- 2) нитрифицирующие;
- 3) азотфиксирующие;
- 4) денитрифицирующие и др.

Патогенные формы микроорганизмы попадают в окружающую среду с различными типами выделений, мочой, гноем, мокротой, слюной, и с трупами людей и животных, погибающих от различных заболеваний. После попадания в почву, большая часть микроорганизмов, не образуя спор, погибает в ближайшее время. Смерть микроорганизмов зависит от ряда причин:

- 1) высушивание;
- 2) отсутствие необходимых питательных веществ;
- 3) воздействие антибиотических веществ, вырабатываемых почвенными бактериями и грабами, солнечных лучей, бактериофагов и т.д. [5].

Быстрое распространение синегнойной палочки во внешней среде способствует легкому инфицированию людей. Она длительное время сохраняется на поверхностях, которая вступала в контакт, простерилизованном медицинском инструментарии и особенно в раневом отделяемом. Заражение происходит, как правило, контактным путем. В медицинских учреждениях, особенно хирургических отделениях, распространены эковары. *P. aeruginosa*, высокоустойчивые к антибактериальным препаратам и антисептикам. Такие штаммы контаминируют лекарственные препараты и поддерживают свою жизнеспособность в неконцентрированных растворах антисептиков и дезинфекторов [6].

Представитель рода *Pseudomonas*, достаточно распространён в окружающей среде, что их можно назвать вездесущими. Такая

жизнеспособность основана на способности усваивать самые разнообразные природные и антропогенные воздействия и размножаться в различных экологических условиях. Сравнительное изучение псевдомонад, выделенных из почвы и морской воды, показало, что морские виды отличаются большей галотолерантностью, баротолерантностью и строением клеточной стенки, в которой меньше гексоминаза, чем у пресноводных штаммов [7].

На сегодня из бактерий рода *Pseudomonas* выделены своеобразные новые по структуре и спектру действия антибиотики (антибиотические вещества), в том числе:

- 1) аминогликозиды;
- 2) монобактамы;
- 3) псевдомоновые кислоты;
- 4) эффективные;
- 5) в отношении антибиотико-резистентных возбудителей заболеваний [8].

1.2 Биология *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Морфология *Pseudomonas aeruginosa*

Синегнойная палочка, достаточное количество времени считалась условно-патогенным микроорганизмом. Даже при приеме антибиотиков, есть вероятность значительного случая возникновения разнообразных гнойно-воспалительных процессов вплоть до генерализованных форм, этиологическим фактором которых явилась *P. aeruginosa*. Многие заболевания, относятся к внутрибольничной инфекции.

У *Pseudomonas aeruginosa* имеются формы: прямая или слегка изогнутые. Монотринг, иногда имеет два или несколько полярно расположенных жгутиков и пили [6].

Pseudomonas представляют собой палочкообразные грамотрицательные бактерии, не образующие спор. Клетки одиночные, прямые или слегка изогнутые, но не спиральные размером 0,5...1,0×1,5...5,0 мкм. Подвижные из-за одного или нескольких полярных жгутиков; в определенных случаях неподвижные. Некоторые экземпляры могут иметь образование латеральных жгутиков с более укороченной длиной волны. Бактерии размножаются делением надвое (бинарное деление) [3].

1.2.2 Физиология и биохимия *Pseudomonas aeruginosa*

Синегнойная палочка – облигатный аэроб; благополучно растет на средах с питательными веществами, выделяя пигмент – пиоцианин, который придает среде сине-зеленый окрас. Также, могут образоваться пигменты и отличающихся цветов. Во время роста псевдомонады часто выделяют

ароматические углеводороды, приносящий культуре бактерий присущий сладковатый аромат жасмина, сирени или карамели.

Бактерии не владеют сахаролитической активностью (состоят в группе неферментирующих бактерий). Используются в продуцирование протеолитические ферменты и бактерициды (пиоцины), имеющие бактерицидные свойства.

Синегнойная палочка обладает О- и Н- антигенами; также имеют токсины, адгезины, пили, некоторые ферменты.

У *P.aeruginosa* присутствуют различные факторы вирулентности: адгезины, эндо- и экзотоксины, ферменты агрессии (гемолизины, нейраминидазу, протеазу, эластазу, лейкоцидины и др.).

При неспособности создавать споры, у синегнойной палочки высокая жизнеспособность. Она является устойчивой к воздействиям антибиотиком ввиду плохой проницаемости внешней мембраны клеточной стенки [9].

Бактерии вида *Pseudomonas* – аэробы. Метаболизм исключительно дыхательного типа с применением кислорода в виде конечного акцептора электронов; в определенных ситуациях заменяющим акцептором электронов может служить нитрат, который предоставляет анаэробный рост.

Основная часть особей в органических факторах роста не нуждаются: каталазоположительные; хемоорганотрофы; различные виды факультативных автотрофов, имеющие возможность использовать в качестве источника энергии H_2 или CO .

Прорастая бактерии, поверхности твердой питательной среды, образуют крупные серовато-грязные или зеленовато-желтые полупрозрачные, слизистые, флюоресцирующие колонии.

В результате проникновения пигмента, выделяемого бактериями, изменяемого окраску питательной среды, а также получения кислоты из глюкозы бактерии относят к четырем группам.

В 1 группу включены пигментообразующие и сбрасывающие глюкозу с образованием кислоты бактерии, а также бактерии, разжижающие и неразжижающие желатин. В нее входят:

1) мезофильные виды, способные проявлять свою жизнеспособность при $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$ и не дающие роста при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$;

2) психофильные – растущие при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и не дающие роста при $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Представителями этой группы, чаще встречающихся в рыбных продуктах, являются *Ps. fluorescens* и *Ps. geniculata*.

Во 2 группу включены бактерии, образующие кислоту из глюкозы, но не способные придавать пигмент питательной среде (*Ps. fragi*, *Ps. pitrefaciens*).

В 3 группу входят бактерии, которые не обладают способностью к пигментообразованию и которые способны подщелачивать среду Хьюга и Лейфсона.

К 4 группе относят бактерии, не воздействующих как на цвет среды, так и на изменение сред Хьюга и Лейфсона.

Диагностические свойства, которыми обладают бактерии рода *Pseudomonas*:

- 1) оксидазоположительные;
- 2) содержат цитохромоксидазу;
- 3) гидролизуют аргинин с образованием аммиака.

1.3 Культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*

Бактерии рода *Pseudomonas* принято считать психрофильными микроорганизмами. Развиваются и проявляют активную жизнеспособность при температуре +4 °С и ниже. Установлено, что в воде псевдомонады остаются жизнеспособными при +5 °С в течение 90...190 сут. Они плохо переносят нагревание. Большая часть психрофильных штаммов этих бактерий начинают отмирать при +37 °С, а мгновенная гибель наблюдается при +70 °С и выше. Самая низшая точка температуры, при которой возможен рост ниже 0 °С. Так, в переохлажденной жидкой питательной среде они размножаются при -5 °С.

Рост бактерий зависит от активности воды (A_w), т.е. количества свободной воды в продукте:

- 1) интенсивное развитие бактерий рода *Pseudomonas* происходит при $A_w = 0,8$;
- 2) наименьшее значение A_w , что допускает рост бактерий, составляет 0,91 [3].

Pseudomonas aeruginosa является:

- 1) крайне неприхотливым микроорганизмом;
- 2) имеет широкие адаптивные возможности;
- 3) способен быстро формировать резистентность к антибиотикам.

Обладая такими свойствами беспигментные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* могут играть ключевую роль в формировании и развитии внутри госпитальных экосистем [10].

Pseudomonas aeruginosa [6]:

- 1) спор не образует;
- 2) образует капсулоподобную оболочку;
- 3) хемооранотроф;
- 4) метаболизм только окислительный;
- 5) хорошо прорастает на простых питательных средах:
 - 5.1) дополнительных поддержек (ингредиентов) для роста не требует;
 - 5.2) многие штаммы образуют растворимый пигмент – пиоцианин:
 - сине-зеленый в нейтральной / щелочной среде;
 - красный в кислой среде;
 - 5.3) имеются штаммы, которые образуют меланиновый пигмент:
 - черный;
 - коричнево-черный;
 - красно-коричневый.

- 6) строгий аэроб;
- 7) оксидазо-положителен;
- 8) сахаролитически мало активна;
- 9) ферментирует глюкозу;
- 10) имеет хорошо выраженную протеолитическую активность,
- 11) разжижает:
 - желатин;
 - свернутую кровяную сыворотку;
 - гидролизует казеин.

2 Объект и методы исследования

2.1 Объект и предмет изучения

Объект исследования. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 2.1), которые:

- являются облигатными аэробами;
- благополучно растут на питательных средах окрашивая ее в сине-зеленый цвет за счет выделения пигмента – пиоцианина;
- являются постоянными обитателями всех объектов окружающей среды (почва, вода, воздух).

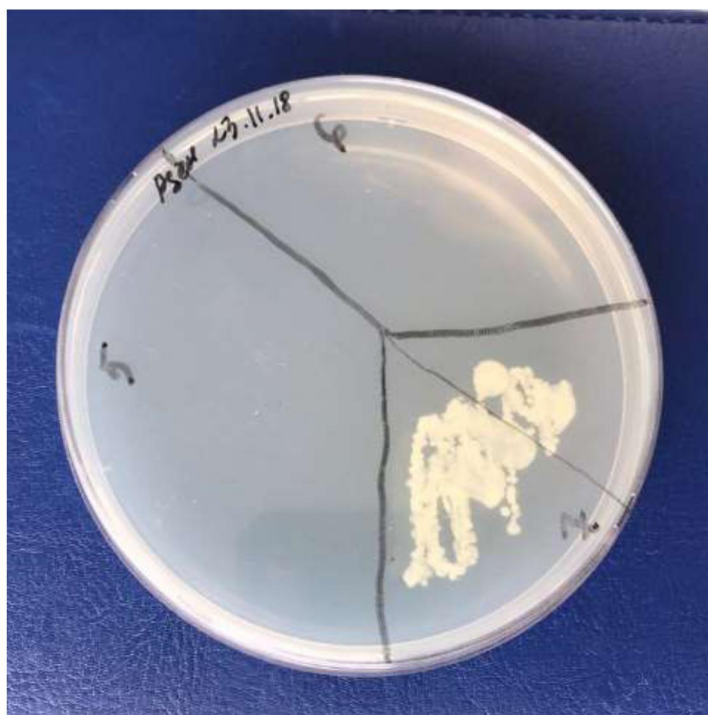


Рисунок 2.1 – Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, полученные в клинической лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ»

Предмет изучения. Изучение чувствительности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

Методы исследования. В процессе работы над дипломом в условиях научно-диагностической лаборатории ТОО «НДЦ АЕГ» мною изучены микробиологические методы исследования: метод отбора смывов согласно межгосударственного стандарта ГОСТ 7702.2.0-2016 [1], микробиологический метод исследования [2].

Предмет изучения. Изучение чувствительности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

2.2 Материалы исследования

Номенклатура лабораторного инвентаря представлен ниже.

2.2.1 Оборудование и приборы

Лабораторные исследования по микробиологии проводили с использованием автоклава, термостата, микроскопа, а также подручных приборов, таких как: лабораторная стеклянная посуда (колбы, чашки Петри, покровные стекла, биологические пробирки), спиртовка, диски.

Основные технические характеристики представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Оборудование и подручные приборы [11-18]

Наименование	Техническая характеристика	Назначение целевое
1	2	3
Автоклав паровой ВК-75-01	Масса, кг – 80. Объем камеры, дм ³ – 75 Загрузочный объем камеры, дм ³ – 54. Режим работы: t °С – время, мин.- Мпа – 132 (120) – 20 (45) – 0,2 (0,11). Размеры камеры, мм – 400 х 600. Габаритные размеры, мм – 740 х 570 х 1070. Напряжение, В – 380.	Стерилизация
Термостат ТС-80	Масса, кг – 60, Габаритные размеры, мм – 615 х 650 х 1250, Время непрерывной работы, часов – 500, Размер рабочей камеры, мм – 400 х 400 х 500, Объем рабочей камеры, л – 80, Температурный диапазон, °С - + 5 - + 60, Электропитание, В/Гц – 220, Потребляемая мощность, ВА – не более 250.	Культивирование
Микроскоп биологический монокулярный «Микромед С-11»	Масса, кг – 2. Габаритные размеры, мм – 115х155х280. Производитель – СПб, Микромед Источник света – светодиод. Источник питания, В – 3*АА, 4.5В. Увеличение микроскопа, крат – 80 – 800. Револьверное устройство – на 3 объектива. Объективы, крат – 4х; 10х; 40х. Окуляры, крат – 20. Предметный столик, мм – 95х95.	Микроскопирование

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3
Подручные приборы	1 Лабораторная стеклянная посуда: 1.1 Стекла предметные. 1.2 Пробирки и флаконы соответствующей вместимости. 1.3 Пробирка полимерная с наполнителем (с пластиковым зондом, с хлопковым наконечником), стерильная – для смывов (рисунок 2). 1.4 Чашки Петри среднего размера – для посева. 1.5 Петля бактериологическая – для взятия и переноса проб. 2 Спиртовка – для поддержания стерильных условий. 3 Диски, пропитанные антибактериальным препаратом. 4 Лабораторный пинцет.	Манипулирование с микроорганизмами, приготовление сред, растворов, тестирование
Рабочая одежда	- стерильный одноразовый халат, - стерильный одноразовый колпак, - стерильные одноразовые перчатки.	Соблюдение правил и требований по технике безопасности
Питательные среды (рисунок 2.2) и реактивы:		
Висмут-сульфит агар (агар Вильсон-Блера), г/л:	Пептический перевар животной ткани–10,0 Мясной экстракт–5,0 Глюкоза–5,0 Натрия гидрофосфат–4,0 Железа сульфат–0,3 Висмута сульфит (индикатор)–8,0 Бриллиантовый зеленый–0,025 Агар-агар–20,0 Вода – 1000 см³ pH –7,7 ± 0,2 (при 25°C)	Висмут-сульфит агар
Мясопептонный агар, г/л:	Пептический перевар животной ткани–10,00 Настой говядины–500,00 Натрия хлорид–5,00 Агар-агар–25,00 Конечное значение pH (при 25°C) –7,5 ± 0,2 Вода – 1000 см³.	Определение общего микробного числа
Ксилоза-лизин-деоксихолатный агар (XLD-агар), г/л:	Дрожжевой экстракт (порошок) – 3,0 Хлористый натрий (NaCl) – 5,0 Ксилоза – 3,75 Лактоза – 7,5 Сахароза – 7,5 L-лизин гидрохлорид – 5,0 Тиосульфат натрия – 6,8 Железо III аммоний цитрат – 0,8 Феноловый красный – 0,08 Деоксихолат натрия – 1,0 Агар – от 9 до 18, Вода – 1000 см³.	культивирование сальмонелл

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3
Actinomycete Isolation Agar, г/л	Натрия казеинат – 2,0 L – аспарагин – 0,1 Натрия пропионат – 4,0 Калия гидрофосфат – 0,5 Магния сульфат – 0,1 Жнлнза сульфат – 0,001 Агар-агар – 15,0 рН 8,1 ± 0,2 (при 25°C)	культивация актиномицетов
XLD (ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар), г/л:	Дрожжевой экстракт – 3,0 L-Лизин – 5,0 Лактоза – 7,5 Сахароза – 7,5 Ксилоза – 3,5 Натрия хлорид – 5,0 Натрия дезоксихолат – 2,5 Натрия тиосульфат – 6,8 Железа аммонийного цитрат – 0,8 Феноловый красный – 0,08 Агар-агар – 15,0 рН 7,4 ± 0,2 (при 25°C)	культивирование сальмонелл
Czapek Dox Agar, г/л:	Сахароза – 30,0 Нитрат натрия – 2,0 Вторичный кислый фосфат калия – 1,0 Магния сульфат – 0,5 Калия хлорид – 0,5 Железа сульфат – 0,01 Агар – 15,0 рН – 7,2 ± 0,2	культивация сапрофитных грибов
Набор красителей по Граму	Раствор красителя генцианвиолет 50мл/2 x 50 мл /950 мл Раствор Люголя 50 мл/2 x 50 мл/ 950 мл Фосфатный буфер 5 мл/10 мл/100 мл Раствор фуксина Циля 50 мл/2 x 50 мл/950 мл Раствор метиленового синего 50 мл/2 x 50 мл/950 мл	Окрашивание микроорганизмов по методу Коха
Антибиотики, как антибактериальные препараты (АБП):		
Oxytetracyclin (T)	- образуется стрептомицетом Streptomyces griseus. - стабильные соединения препарата окситетрациклина солянокислого основания сохраняют свою активность на протяжении 36-48 месяцев.	действующее вещество: окситетрациклин дигидрат
Colistin (CL)	- производное метансульфоновой кислоты колистина, - действие оказывает для грамотрицательных бактерий.	действующее вещество: Колистиметат натрия
Morbofloxacin 5 (MAR5)	- синтетический антибиотик, - имеет широкий спектр антибактериального действия	действующее вещество: марбофлоксацин

Продолжение таблицы 2.1

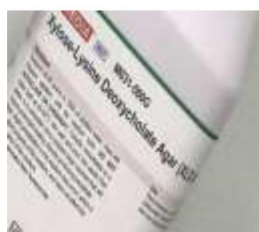
Doxycycline 30 (DXT)	- полусинтетический тетрациклин, - имеет широкий спектр действия	действующее вещество: доксициклин
Sulfamenmoxazole Trimethoprim (SXT)	- комбинированный противомикробный препарат, - имеет широкий спектр действия	действующее вещество: Сульфаметоксазол + Триметоприм



а



б



в



г



д

а) питательная среда № 1 Actinomycete Isolation Agar; б) питательная среда № 2 Bismuth Sulphite Agar; в) питательная среда № 3 Xylose-Lysine Deoxycholate Agar; г) питательная среда № 4 Czapewski Dox Agar; д) питательная среда № 5 Sabouraud Dextrose Agar

Рисунок 2.2 – Питательные среды, использованные для микробиологических исследований

2.3 Методы исследования

Исследования складывались на основе проведения теоретических (работа в библиотеках города и университетов), полевых (отбор проб на объекте сельскохозяйственного назначения) и лабораторных методов работ (метод Коха, тестирование на АБП).

Исследования в научной библиотеке проводили в течение всего учебного года, исследования полевые и экспериментальные в лаборатории микробиологического характера были проведены с 22.11.2018 по 18.02.2019 г в клинической лаборатории микробиологии ТОО «НДЦ АЕГ».

2.3.1 Микробиологические лабораторные испытания

Микробиологические испытания проводились в соответствии с прописанными в ГОСТ Р 54755-2011 указаниями [12]:

1 Приготовление стеклянной лабораторной посуды для проведения последующего микробиологического испытания производили по ГОСТ ISO 7218-2015[13].

2 Приготовление питательных сред осуществляли по инструкции, наклеенной производителем на товарной банке со смесью.

Питательная среда после смешивания порошка с дистиллированной водой нагревается до кипения, переливается и автоклавировается (рисунок 2.3) в течение 15 минут при температуре 121 °С [14].

3 Разлив расплавленной питательной среды определенного объема разведения производили около зажженной спиртовки в чашки Петри при температуре среды 44°C-47°C согласно ГОСТ ISO 7218-2015. При этом слой среды в чашке Петри составлял не менее 3 мм. Важно наливать расплавленную питательную среду таким образом, чтобы исключить ее смешивание с инокулятом, т.е. посевным материалом. Только после разлива, расплавленную среду и инокулят тщательно перемешивают плавными движениями чашки вначале взад-вперед, затем в разные стороны с права налево и, далее круговыми движениями с целью равномерного распределения всех имеющихся в инокуляте микроорганизмов в питательной среде.



а



б

Рисунок 2.3 – Автоклавирование питательной среды: а) общий вид автоклава; б – режим стерилизации указан на циферблате

4 Чашки Петри помещают на лабораторный стол, т.е. на холодную горизонтальную поверхность для того, чтобы дать время затвердеть питательной среде (примерно 10 мин) [13].

2.3.2 Процедура посева бактерий на агаризованные питательные среды

Согласно ГОСТ 26670-91 был использован поверхностный метод посева бактерий на питательные среды [15].

На подсушенную агаризованную среду наносят либо жидкий продукт (смыв), либо проводят разведение навески, после немедленно растирают по поверхности среды равномерно шпателем.

Просеянные на питательные среды культуры переносят в термостат для культивирования. Время культивации составляет для *Pseudomonas aeruginosa* 24 часа.

3 Результаты исследования

3.1 Отбор смывов

Отбор смывов производили на сельскохозяйственном птицеводческом объекте (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Отобранные для микробиологической работы смывы (разъяснения смотреть в тексте)

Отбор проб производили стерильным одноразовым пластиковым зондом с хлопковым наконечником из полимерной пробирки с наполнителем. Количество полученных проб 7. Смывы, согласно ГОСТ Р 54004-2010 [11], брались с различных частей территории объекта.

Отобранные смывы имели обозначение:

- № 1 «Территория вольера лошади»;
- № 2 «Территория вольера бородача»;
- № 3 «Территория птичника (смывы из коридора и пола фермы);
- № 4 и № 5 «Производственные помещения (возможно обитание насекомых и грызунов);
- № 6 «Производственная площадка (двор)»;
- № 7 «Цех убоя птиц» (от стола разморозки птичьего мяса).

Полученные смывы оперативно автотранспортом были доставлены в лабораторию для проведения микробиологических работ.

3.2 Культивирование и количественный учет микроорганизмов

Для микробиологической работы смывы первоначально были подготовлены (рисунок 3.2).

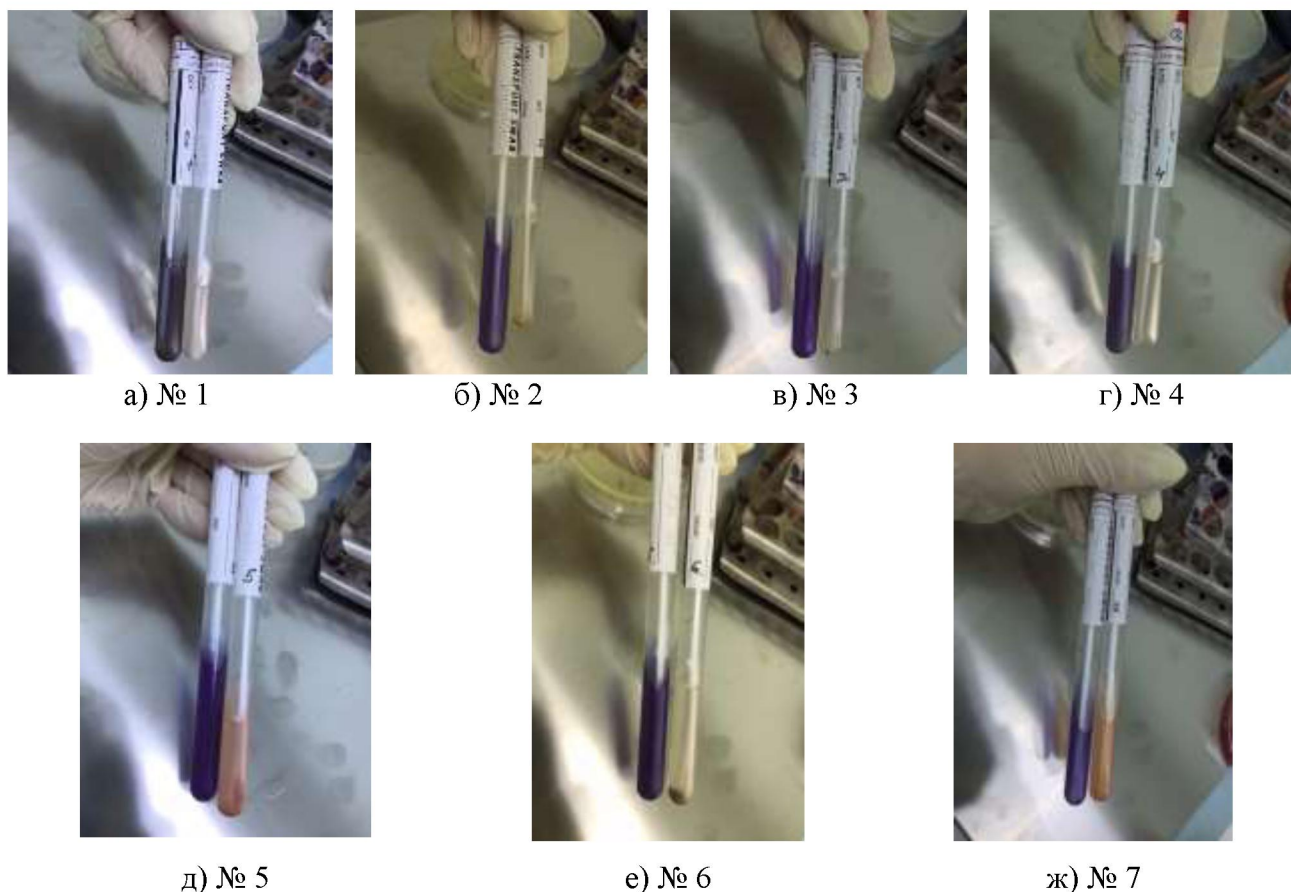


Рисунок 3.2 – Подготовленные для микробиологической работы смывы

К рисунку 3.2 следует дополнить:

- пробирки с темно-сине-фиолетовой средой – это бульон Макконки, представленная жидкой средой, предназначенная для определения и подсчета колиформных микроорганизмов, согласно Методике Европейской Фармакопее.
- пробирки с оранжево-жёлтым раствором – это селенитовая среда, как среда обогащения, предназначена для выделения шигелл Зонне и сальмонелл (исключение *S. choleraesuis*) из испражнений, мочи, рвотных масс.

Селенитовая среда готовится:

- 1) на буферном растворе из натрия фосфата (0,7% двузамещенного и 0,3% однозамещенного) при pH 7;
- 2) далее к буферу добавляют:
 - 2.1) 0,5 % пептона «Спофа»;
 - 2.2) 0,4 % лактозы (или маннит).

Полученную таким образом селенитовую среду:

- 1) разливают по 50 мл;
- 2) стерилизуют при 112 °C на протяжении 30 мин.

Перед употреблением к селенитовой среде обязательно добавляют селективный стерильный фактор – это 10 %-ный раствор натрия селенистокислого в конечной концентрации 0,4 %. Посевная доза допускается большой.

Просеянные на питательные среды культуры переносят в термостат при температуре 27-30 °С для культивирования. Время культивации, как было отмечено выше, составляет для *Pseudomonas aeruginosa* 24 часа.

По истечении нужного времени культуры были исследованы на наличие роста *Pseudomonas aeruginosa*. Очень хороший рост *Pseudomonas aeruginosa* был зафиксирован со смыва № 7, выделенного со стола разморозки птичьего мяса.



Рисунок 3.3 – Отбор мазка для окрашивания по Граму

В целях подтверждения провели биохимическую идентификацию колоний *Pseudomonas aeruginosa* путем вначале отбора мазка из культуры не старше 24-часового возраста (рисунок 3.3), затем мазок был окрашен по Граму согласно ГОСТ 30425-97.

Как видно из рисунка 3.3, обозначение 1 указывает на место взятия пробы (мазка) для дальнейшего окрашивания по Граму и последующего переноса на новую питательную среду с целью получения чистой культуры.

Окрашивание по Граму в модификации Хукера проводили в следующей последовательности:

- 1) мазки окрашивают раствором кристаллического фиолетового с щавелевокислым аммонием;
- 2) через 0,5-1,0 мин:
 - 2.1) с окрашенного мазка удаляют:
 - бумагу;
 - избыток красителей;
 - 2.2) мазок промывается проточной водой;
 - 2.3) на мазок наносят йодный раствор по Бурке;
- 3) спустя 0,5-1,0 мин мазок:
 - промывают 96 % этиловым спиртом до стекания с мазка окрашенной струйки;

- 4) мазок промывается водой для удаления спирта;
- 5) окрашивают мазок в растворе сафранина 2-3 минуты;
- 6) промывают мазок водой и высушивают.

Результат. Бактерии окрашиваются [16]:

- грамположительные – в сине-фиолетовый цвет (образуют с основным красителем стойкое соединение);

- грамотрицательные – в красный цвет (теряют основной краситель).

После процедуры окрашивания по Граму и микроскопии, мы зафиксировали прямые или изогнутые неферментирующие грамотрицательные палочки (0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 мкм) (рисунок 3.4).

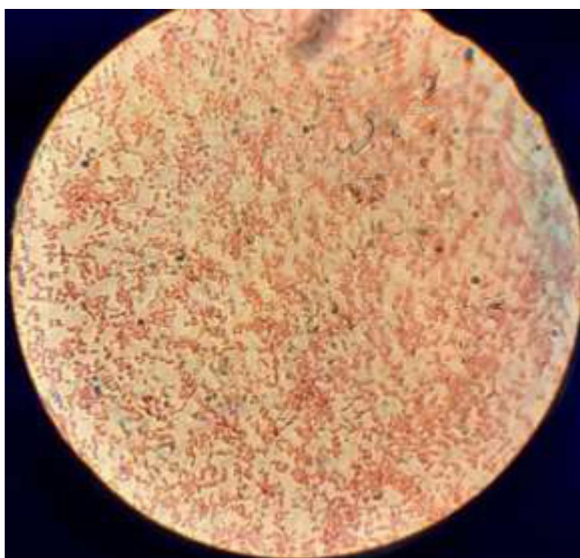


Рисунок 3.4 – Микроскопирование бактерии *Pseudomonas aeruginosa*

После того как выявлено наличие в данном материале необходимого вида бактерий, были пересажены бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с первой чашки Петри на отдельную твердую питательную среду для получения чистой культуры (рисунок 3.5).

Получаемая чистая культура, как это видно из рисунка 3.5, была посеяна по методике, изложенной в ГОСТ 26670-91. Посев на плотную среду производили бактериологической иглой методом штриха. Культивирование проводили в течение 24 ч.

3.3 Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии рода *Pseudomonas aeruginosa*

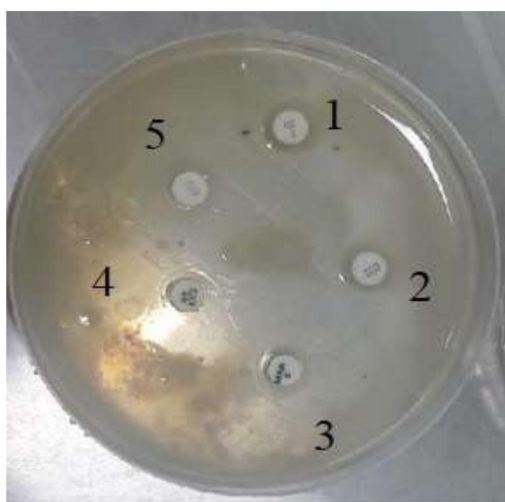
Следующий этап является основным и направлен на мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии рода *Pseudomonas aeruginosa*.



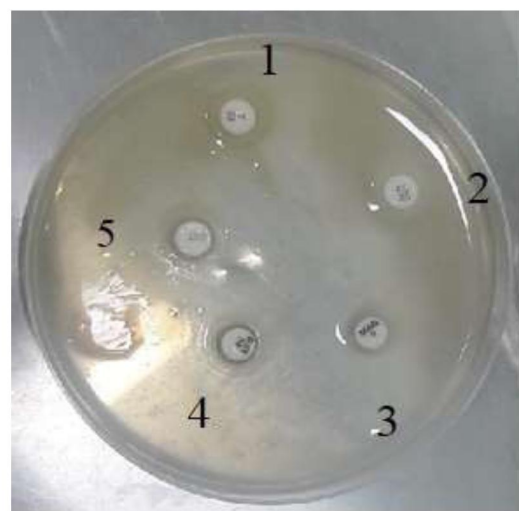
Рисунок 3.5 – Чистая культура рода *Pseudomonas aeruginosa*

Для этого полученный клинический материал переносим на питательную среду, но с добавлением методом дисков антибиотиков (на фотоизображении рисунка 3.6 препараты имеют следующую нумерацию):

- 1) Oxytetracyclin;
- 2) Colistin;
- 3) Morbofloxacin;
- 4) Doxycycline;
- 5) Sulfamenmoxazole/Trimethoprim.



а



б

Рисунок 3.6 – Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам

Как видно из рисунка 3.6, для определения чувствительности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам был использован метод диффузии препаратов на бумажных дисках в агаризованной питательной среде.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* были культивированы в течение 24 часов при температуре 27-30 °C.

Из рисунка 3.6 видим, что чувствительность бактерий *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен, в следствии наличия зон отсутствия роста вокруг бумажных дисков (наличие «ободка» вокруг дисков), пропитанных антибиотикам:

- 1) высоко чувствителен к Oxytetracyclin;
- 2) высоко чувствителен к Colistin;
- 3) слабо чувствителен к Morbofloxacin;
- 4) слабо чувствителен к Doxycycline;
- 5) слабо чувствителен к Sulfamenmoxazole/Trimethoprim.

Доказательством служат круглые зоны вокруг диска, свидетельствующие об отсутствии бактериального роста, которые образуются при высокой (примерно 10 мм и более) и слабой чувствительности (зона менее 10 мм) к данному антибактериальному препарату.

Таким образом, результатом исследования стало отнесение бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к категории высокой (Oxytetracyclin, Colistin) и слабой (Morbofloxacin, Doxycycline, Sulfamenmoxazole/Trimethoprim) чувствительности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Выводы:

- изучены ключевые биологические свойства бактерий *Pseudomonas aeruginosa*: оптимальная температура роста при 24 часов культивирования составляет 27-30 °C;
- выявленные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* по результатам исследований отнесены к категории высокой (Oxytetracyclin, Colistin) и слабой (Morbofloxacin, Doxycycline, Sulfamenmoxazole/Trimethoprim) чувствительности.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЙ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 ГОСТ 7702.2.0-2016. Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды.
- 2 СТ РК ISO 16266-2012. Качество воды. Обнаружение и подсчет микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации (ISO 16266:2006 Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — method by membrane filtration (IDT).
- 3 Долганова Н.В., Першина Е.В., Хасанова З. К. Микробиология рыбы и рыбных продуктов: Учебное пособие. – 2-е изд., перераб. И до. – СПб.: Издательство «Лань», 2012. – 288с.
- 4 Коростелёва Л.А., Коцаев А. Г. Основы экологии микроорганизмов: Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2013г. – 240 с.
- 5 Просеков А. Ю Общая биология и микробиология: учебное пособие, 2-е издание, исправ. И доп. – СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320с
- 6 Борисов Л.Б Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2005. 736с.: ил.
- 7 Рубан Е. Л Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986.
- 8 Смирнов В.В., Киприанова Е. А Бактерии рода *Pseudomonas*; Отв.ред. Айзенман Б. Е.; АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. – Киев: Наук. Думка, 1990. – 264 с.
- 9 Воробьев А.А, А.С. Быков, Е.П. Пашков и др. Основы микробиологии и иммунологии: учеб. Для студ. Учреждений сред. проф. мед. образования – 7-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2014. – 288 с.
- 10 Жданова О.С., Е.П. Красноженов, Э.А. Соснин, Л.В. Гудкова и др. Антибиотикорезистентность штаммов *Pseudomonas Aeruginosa* с разной способностью к синтезу пиоцианина // Альмахан клинической медицины. – 2013. - №28. – С. 13 – 17.
- 11 ГОСТ Р 54004-2010 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологического испытания.
- 12 ГОСТ Р 54755-2011 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*
- 13 ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.
- 14 Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
- 15 ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

16 ГОСТ 30425-97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности.

17 Джей, Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Д. Лесснер; Пер. с англ. Е.А. Баранова. - М.: БИНОМ. ЛЗ, 2012. - 886 с.

18 Ганина, В.И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: Учебное пособие / В.И. Ганина, Н.С. Королева, С.А. Фильчакова. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 352 с.

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии Pseudomonas aeruginosa»
Автор:	Ахметова Айым Берікқызы
Координатор:	Гуля Джамалова
Дата отчета:	2019-05-06 07:18:33
Коэффициент подоби́я № 1: ?	7,8%
Коэффициент подоби́я № 2: ?	1,1%
Длина фразы для коэффициента подоби́я № 2: ?	25
Количество слов:	4 913
Число знаков:	38 958
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	26



К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены соответственно.

Количество выделенных слов 5