

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение

«Средняя школа №33» города Смоленска



Учебно-исследовательский проект по биологии  
на тему:

**«Исследование микрофлоры, выделенной из  
сельскохозяйственных продуктов. Проблема  
резистентности микроорганизмов»**

Работу выполнила:

Тюрина Дарья Эдуардовна ученица 11 класса Г «СШ№33»

Руководитель проекта:

Васильева Ольга Ивановна - учитель биологии «МБОУ СШ №33»

Эйдельштейн Инна Александровна- к.б.н, научный сотрудник

НИИ АХ СГМУ

Смоленск 2023

## Оглавление:

Введение.....	3-5
1. Теоретическая часть.....	6-9
1.1 Что такое антибиотикорезистентность?.....	6
1.2 Причины появления устойчивости к антибактериальным препаратам.....	6-7
1.3 Применение антибактериальных препаратов в животноводстве.....	7
1.4 Как распространяется устойчивость к антибиотикам в сельском хозяйстве.....	7-8
1.5 Наличие резистентных микроорганизмов в овощах и фруктах.....	8-9
2. Практическая часть.....	10-19
2.1 Проведение смывов с поверхности сельскохозяйственной продукции	10
2.2 Определение чувствительность выделенной микрофлоры к антибактериальным препаратам.....	13-17
2.3 SNP-генотипирование изолята <i>A. Baumannii</i> .....	17-19
2.4. Депонирование выделенных изолятов в коллекцию микроорганизмов НИИ АХ.....	19
Заключение.....	20
Список литературы.....	21

# Введение

## *Актуальность темы:*

По данным комиссии, собранной британским министерством здравоохранения в 2014–2016 гг., ежегодно около 700 000 человек по всему миру умирает от бактериальных инфекций, вызванных микроорганизмами невосприимчивыми к действию антибиотиков<sup>[1]</sup>. В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), число случаев инфицирования человека микроорганизмами, устойчивыми к антибиотикам, увеличивается с каждым годом, что приводит к повышенной смертности людей, удлинению срока их госпитализации и повышению экономических затрат на лечение<sup>[2]</sup>.

В 2016 году Генеральная Ассамблея ООН признала использование антибиотиков в животноводстве одной из основных причин резистентности к противомикробным препаратам у людей<sup>[3]</sup>.

Резистентные бактерии могут передаваться от животных к человеку через с/х-продукцию, продукты, неподвергающиеся термической обработке: овощи, фрукты, ягоды, а также через окружающую среду: воду, почву, загрязненные поверхности

<b><i>Проблема:</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• микробиологический анализ сельскохозяйственных продуктов</li></ul>
<b><i>Объект исследования:</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• сельскохозяйственные продукты, купленные на рынке (огурец, помидор, клубника, салат, мясо)</li></ul>
<b><i>Предмет исследования:</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• микроорганизмы, смытые с с/х продуктов</li></ul>
<b><i>Цель:</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• исследовать микрофлору, выделенную из сельскохозяйственных продуктов, оценить клиническую значимость полученных</li></ul>

	<p>изолятов и провести их типирование</p>
<b>Задача исследования:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>исследовать чувствительность микроорганизмов, выделенных с поверхности с/х продуктов, к антибактериальным препаратам</li> </ul>
<b>Гипотеза:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>с/х продукты обсеменены резистентными клинически значимыми штаммами микроорганизмов</li> </ul>
<b>Материалы исследования:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>овоци (огурец, помидор, салат), фрукты(клубника), мясо(куриная грудка), купленные на рынке</li> <li>пробирки с физиологическим раствором (0,9%)</li> <li>чашки Петри («Фирма Медполимер», г. Санкт-Петербург) с агаром Мюллера-Хинтон и Колумбийским агаром</li> <li>стерильный ватный тампон</li> <li>термостат лабораторный «BINDER», Германия</li> <li>прибор для идентификации микроорганизмов MALDI-TOF масс-спектрометр Biotyper</li> <li>Термостат для культивирования</li> <li>микробиологические петли объемом 1 мкл</li> <li>лабораторный шейкер «VORTEX»</li> <li>диски с антибиотиками (Amikacin (30мкг), Meropenem (10мкг), Ciprofloxacin (5мкг), Trimethoprim/sulfamethoxazole (25мкг), Imipenem (10мкг), Gentamicin (30мкг))</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Наборы реагентов «SNP-Скрин»</li> </ul>
<b>Методы исследования:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• метод смыва с поверхности исследуемого объекта для выявления микроорганизмов в сельскохозяйственной продукции</li> <li>• морфологическая оценка выросших колоний на агаре Мюллера-Хинтона, на Колумбийском агаре</li> <li>• идентификация микроорганизмов</li> <li>• диско-диффузионный метод для оценки чувствительности бактерий к антимикробным препаратам</li> <li>• SNP-генотипирование изолятов, выделенных из сельскохозяйственной продукции</li> </ul>
<b>Сроки исследования:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 06.2023-08.2023</li> </ul>
<b>Значимость исследования:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• позволяет наглядно показать, что сх продукция содержит разнообразную микрофлору, поэтому очень важно употреблять в пищу только хорошо вымытые и термически обработанные продукты</li> </ul>

## 1. Теоретическая часть

### 1.1 Что такое антибиотикорезистентность?

Бактерии являются одними из древнейших существ на Земле. Чтобы выживать в меняющихся условиях, им приходится активно развиваться и приспосабливаться в результате давления естественного отбора посредством случайных мутаций. Бактерии, у которых возникают нужные мутации, выживают, образуются резистентные штаммы. Аналогичные процессы происходят при воздействии на них антибиотиков, в результате чего бактерии приобретают антибиотикорезистентность.

Антибиотикорезистентность — это устойчивость микроорганизмов к противомикробным препаратам. Устойчивые штаммы труднее лечить, требуются более высокие дозы или альтернативные лекарства, которые могут оказаться более токсичными<sup>[4]</sup>.

Приобретая устойчивость к антибиотикам, бактерии могут образовывать ферменты, способные разрушать действующее вещество антибиотика или вырабатывать фермент, который способствует присоединению какой-либо химической группы к антибиотику, что приводит к угнетению действия антибактериального препарата. В результате бактерии становятся к ним не чувствительны, антибиотики перестают выполнять свою функцию<sup>[5]</sup>

## **1.2 Причины появления устойчивости к антибактериальным препаратам**

Устойчивость к противомикробным препаратам возникает в результате постепенной мутации бактерий, вирусов, и утраты ими восприимчивости к лекарственным препаратам, затрудняя лечение инфекций и повышая риск распространения, тяжелого течения и летального исхода болезней.

К основным причинам возникновения антибиотикорезистентности относится нерациональная тактика подбора антибактериальной терапии в медицинских учреждениях (назначение антибактериальных препаратов при вирусных инфекциях, применение антибиотиков с целью профилактики развития бактериальных осложнений, неправильный выбор антибиотика,

несоблюдение назначенную лечащим врачом дозу и кратность приема), ненадлежащий инфекционный контроль в больницах и клиниках, отсутствие новых видов антибиотиков.

Также причина возникновения резистентности бактерий лежит на стыке медицинской и ветеринарной науки, ведь нецелесообразное и чрезмерное использование антибиотиков в сельском хозяйстве является селективирующим фактором отбора штаммов, несущих те или иные факторы резистентности.

### **1.3 Применение антибактериальных препаратов в животноводстве**

Антибактериальные препараты (АБ) применяются с 50-х годов прошлого столетия в качестве добавок к корму для животных, стимулируя биохимические процессы в организме животных, что ускоряет их рост, повышает продуктивность поголовья, активизирует защитные функции организма, а также в целях профилактики заболеваний (порядка 50 % антибиотиков, производимых в мире, используются в сельском хозяйстве).

Всемирная организация здравоохранения пришла к выводу о том, что ненадлежащее применение антибиотиков в животноводстве является фактором, способствующим появлению и распространению антибиотикоустойчивых микроорганизмов<sup>[6]</sup>.

С целью ограничения использования антибиотиков в качестве стимуляторов роста в кормах животных Евросоюз принял постановление №1831/2003, раздел 25 которого запрещает использование всех антибактериальных стимуляторов роста в кормах для с/х животных<sup>[7]</sup>

### **1.4 Как распространяется устойчивость к антибиотикам в сельском хозяйстве**

Сельскохозяйственные животные являются резервуарами антибиотикорезистентных бактерий. Неоднократное воздействие антибактериальных препаратов приводит к селективному давлению на микробиом животных, что дает преимущество резистентным штаммам для роста и размножения.

Резистентные бактерии могут передаваться от животных к человеку через сельскохозяйственную продукцию (мясо, молочные продукты, рыбу, яйца), продукты, неподвергающиеся термической обработке: овощи, фрукты, ягоды, а также через окружающую среду: воду, почву, загрязненные поверхности. Такие микроорганизмы вызывают пищевые токсикоинфекции (сальмонеллы, кампилобактерии и листерии), а также болезни вызванные мультирезистентными возбудителям инфекций у человека (энтерококками, синегнойной палочкой и различными типами кишечных палочек).

Передача устойчивых штаммов может происходить между различными хозяевами при их непосредственном взаимодействии, при контакте с содержащими бактерии физиологическими субстанциями (слюна, фекалии, кровь и т.д.)

Резистентные бактерии могут передаваться от животных к людям, которые профессионально заняты в сельском хозяйстве, работая на птицефермах, свинокомплексах, фермах, в рыбных хозяйствах.

### **1.5 Наличие резистентных микроорганизмов в овощах и фруктах**

Было проведено исследование, позволяющее оценить уровень контаминации фруктов, овощей грамотрицательными бактериями, устойчивыми к цефалоспорином третьего поколения.

Были взяты 491 образец фруктов и овощей, собранных на 5 рынках и 7 фермах. Анализируя микроорганизмы, смытые с фруктов и овощей, обнаружили бактерии, относящиеся к неферментирующим видам. Микрофлора была представлена разнообразием видов и профилей

устойчивости к противомикробным препаратам. Большинство изолятов *K.pneumoniae* были продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра.

Это исследование позволило установить, что фрукты и овощи могут являться резервуаром устойчивых к ЦС III поколения грамтрицательных бактерий, а также микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью<sup>[8]</sup>

## 2 Практическая часть

**Цель работы:** изучить микробиологические свойства сельскохозяйственных продуктов

**Задача:** проверить чувствительность микроорганизмов, выделенных с поверхности с/х продуктов, к антибактериальным препаратам

### 2.1 Проведение смывов с поверхности сельскохозяйственной продукции

- Стерильным ватным тампоном сделали смывы с поверхности фруктов, овощей и мяса
- Посеяли микроорганизмы на чашки с питательными средами
- Поставили в термостат (+35°C) для культивирования бактерий
- Через 24 часа получили результаты

**Результат:** на чашках Петри наблюдается обильный рост пигментированных (розовых, темно-синих, бледно-желтых, белых), шероховатых, гладких, слизистых, с явным поверхностным блеском колоний микроорганизмов (некоторые колонии образуют зоны гемолиза  $\alpha$ -типа)

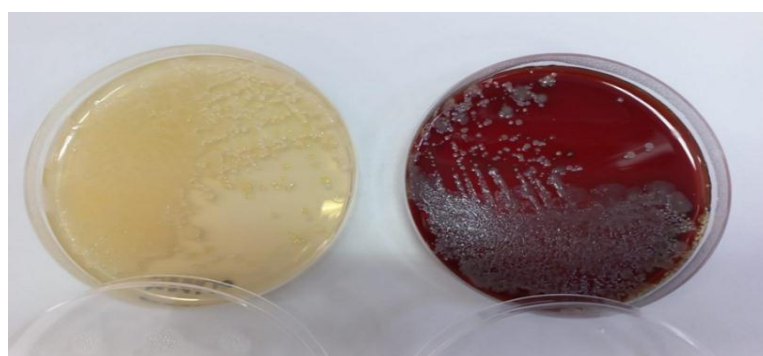


Рисунок 1. Колонии микроорганизмов, выросших в смывах с огурца

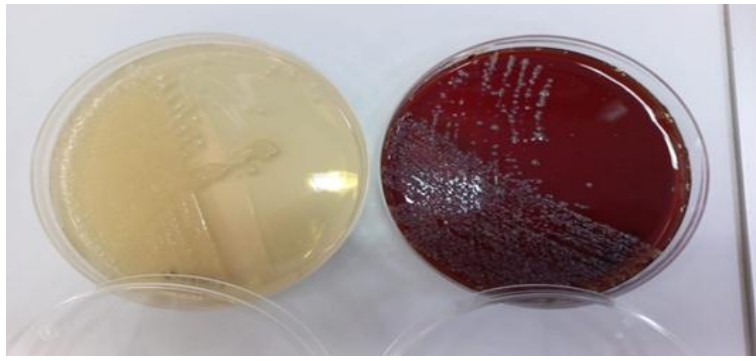


Рисунок 2. Колонии микроорганизмов, выросших в смывах с мяса

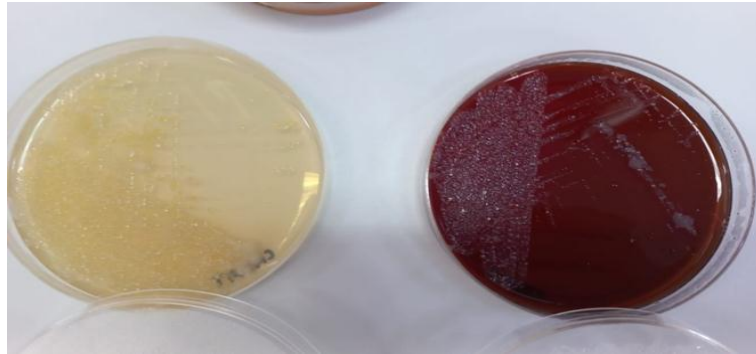


Рисунок 3. Колонии микроорганизмов, выросших в смывах с салата

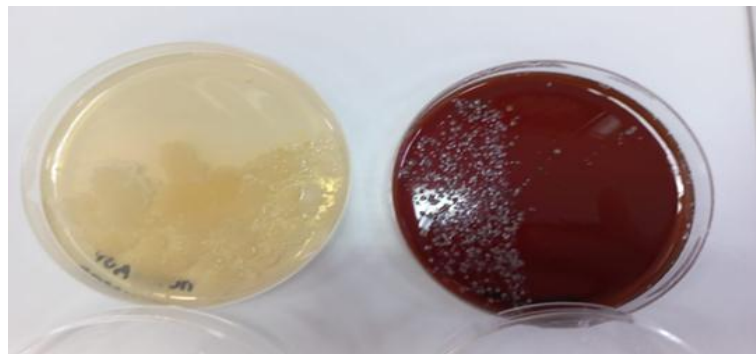


Рисунок 4. Колонии микроорганизмов, выросших в смывах с помидора

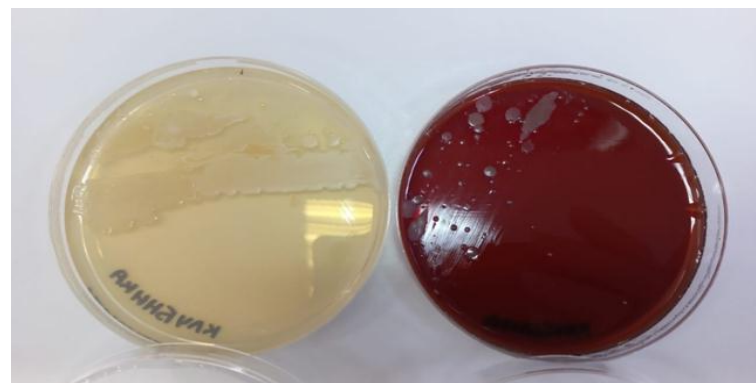


Рисунок 5. Колонии микроорганизмов, выросших в смывах с клубники

- После идентификации колоний на масс-спектрометре MALDI–TOF установили виды микроорганизмов:

Таблица 1

Название образца/номер колонии	Результат
Салат №1	<i>Enterobacter cloacae</i>
Салат №2	<i>Bacillus subtilis</i>
Салат №3	<b><i>Acinetobacter junii</i></b>
Клубника №1	<i>Bacillus megaterium</i>
Клубника №2	<b><i>Acinetobacter lwoffii</i></b>
Огурец №1	<i>Aerococcus viridans</i>
Огурец №2	<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>
Огурец №3	<b><i>Acinetobacter courvalinii</i></b>
Огурец №4	<i>Staphylococcus sciuri</i>
Огурец №5	<b><i>Acinetobacter courvalinii</i></b>
Помидор №1	<b><i>Acinetobacter courvalinii</i></b>
Помидор №2	<i>Staphylococcus sciuri</i>
Помидор №3	<b><i>Acinetobacter soli</i></b>
Помидор №4	<i>Bacillus siamensis</i>
Помидор №5	<b><i>Acinetobacter soli</i></b>
Мясо №1	<i>Yersinia intermedia</i>
Мясо №2	<i>Serratia proteamaculans</i>
Мясо №3	<i>Serratia liquefaciens</i>

**Результат:** микробиологически доказана обсемененность с/х продуктов микроорганизмами, имеющими клиническое значение. Разнообразие видов *Acinetobacter* spp. указывает на то, что клинически значимые

микроорганизмы проникают в стационары из окружающей среды, а также вместе с пациентами, которые ими колонизированы.

**Вывод:** на каждом виде объекта выращенные *Acinetobacter* spp., были отобраны для дальнейшей работы, так как представляют клинический интерес

## 2.2 Определение чувствительность выделенной микрофлоры к антибактериальным препаратам

- Провели перепасаж для получения свежей культуры
- Поставили диски с антибиотиками (Amikacin (30мкг), Меропенем (10мкг), Ciprofloxacin (5мкг), Trimethoprim/sulfamethoxazole (25мкг), Imipenem (10мкг), Gentamicin (30мкг)) для определения чувствительности культур

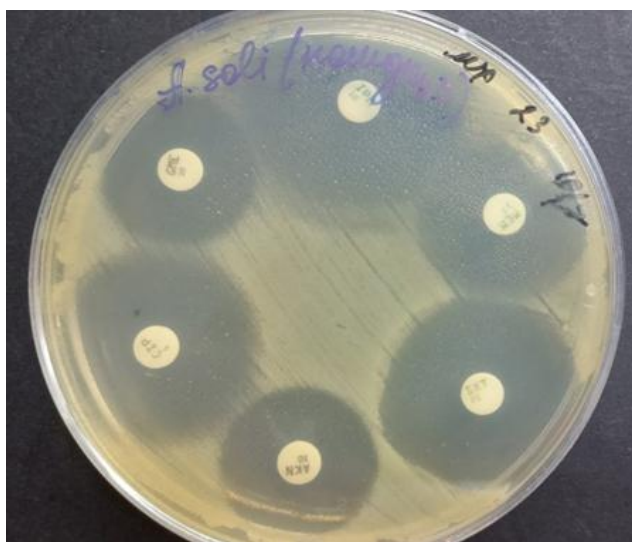


Рисунок 6. Чувствительность *Acinetobacter soli*, смывого с помидора

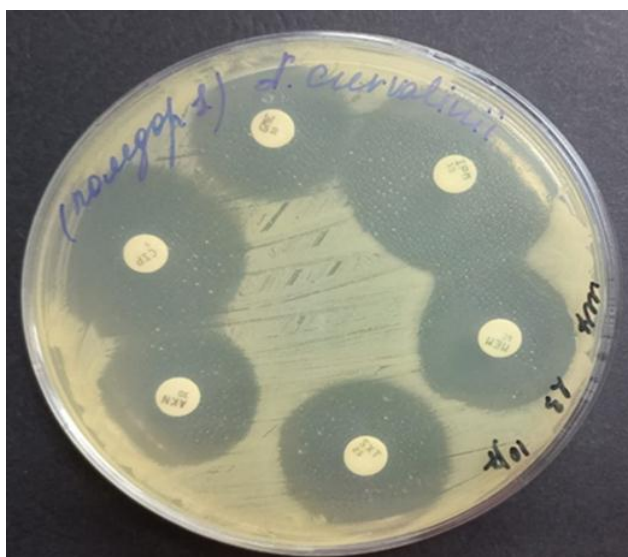


Рисунок 7. Чувствительность *Acinetobacter courvalinii*, смывого с помидора

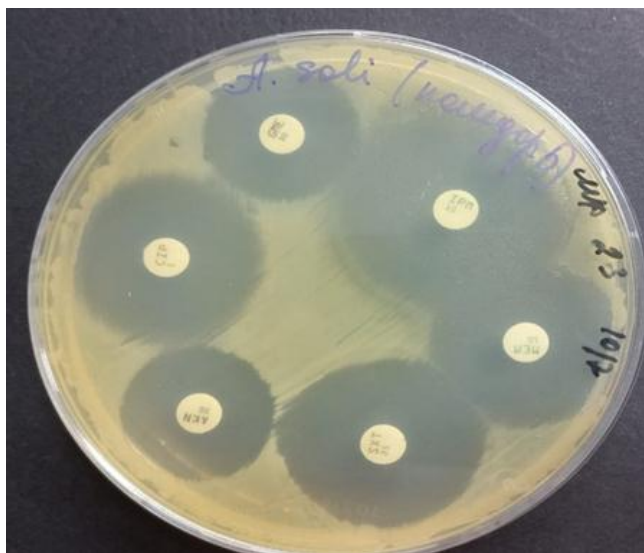


Рисунок 8. Чувствительность *Acinetobacter soli*, смывого с помидора

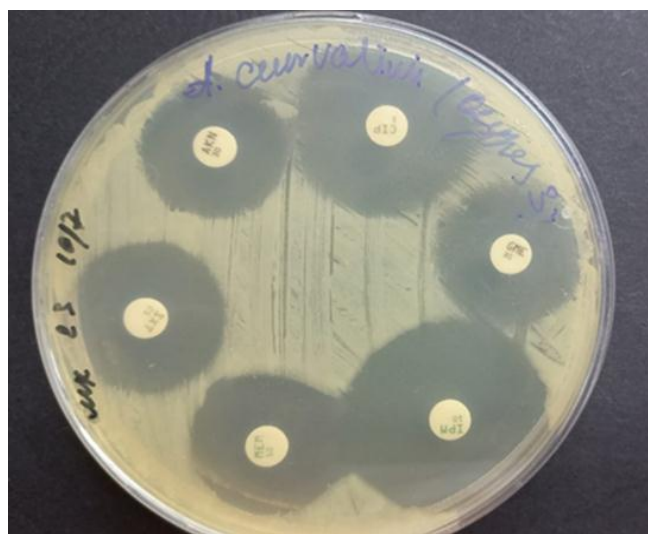


Рисунок 9. Чувствительность *Acinetobacter courvalinii*, смывого с огурца

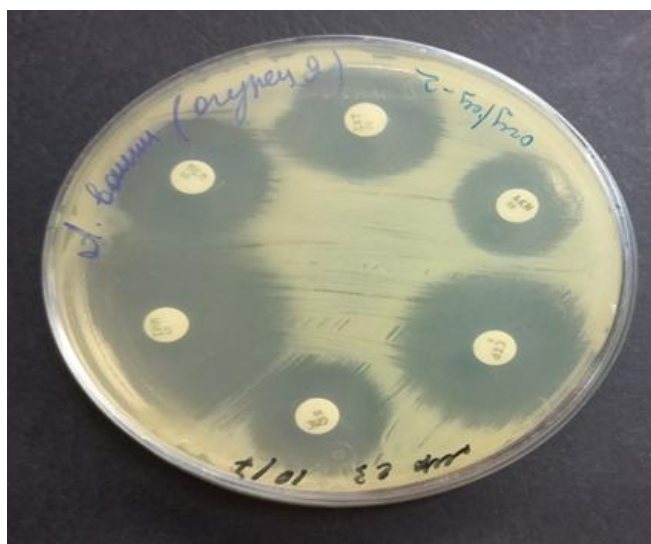


Рисунок 10. Чувствительность *Acinetobacter baumannii*, смытого с огурца

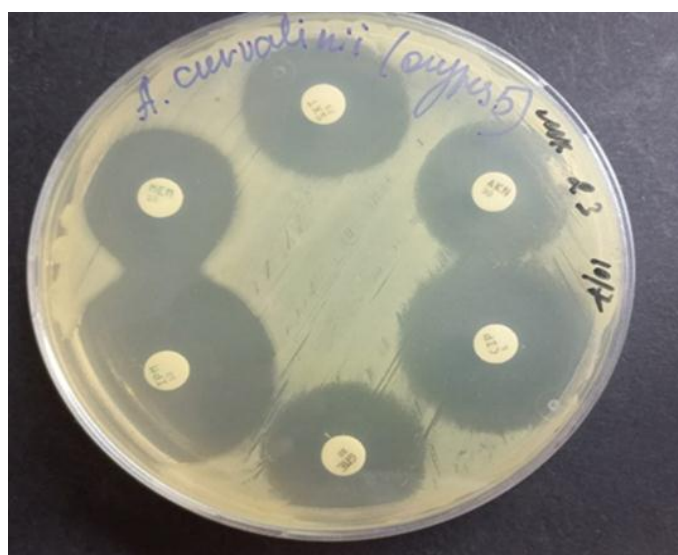


Рисунок 11. Чувствительность *Acinetobacter courvalinii*, смытого с огурца



Рисунок 12. Чувствительность *Acinetobacter junii*, смытого с салата



Рисунок 13. Чувствительность *Acinetobacter lwoffii*, смытого с клубники

**Результаты:** все штаммы *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter courvalinii*, *Acinetobacter soli* чувствительны к данным видам антибиотикам. У штамма *Acinetobacter lwoffii* наблюдается медленный вуалевый рост.

- Измерили зоны подавления роста колоний вокруг дисков с АБ

Таблица 2

	IPM	MEM	SXT	AKN	CIP	GME
<i>A. junii</i> (салат3)	32	28	20	24	28	24
<i>A. baumannii</i> (огурец2)	32	24	24	20	28	24
<i>A. courvalinii</i> (огурец3)	32	22	24	24	30	24
<i>A. courvalinii</i> (огурец5)	32	22	24	24	30	24
<i>A. courvalinii</i> (помидор1)	28	24	24	24	28	24
<i>A. soli</i> (помидор3)	30	28	32	24	28	24
<i>A. soli</i> (помидор5)	32	28	28	24	28	24
<i>A. lwoffii</i> (клубника2)	-	-	-	-	-	-

Acinetobacter baumannii

Поделиться ссылкой

### Интерпретация результатов

Антибиотик	Метод	Исходное Значение	Необработанная оценка S/I/R	Экспертная оценка S/I/R	Комментарий
amikacin	DD	20	S	S	
meropenem	DD	24	S	S	
ciprofloxacin	DD	28	I	I	
imipenem	DD	32	S	S	
gentamicin	DD	24	S	S	
trimethoprim-sulfamethoxazole	DD	24	S	S	

S — микроорганизм чувствителен к антибиотику  
 I — микроорганизм умеренно чувствителен к антибиотику  
 R — микроорганизм абсолютно устойчив к антибиотику

Рисунок 12. Интерпретация результатов

**Результат:** после интерпретации полученных данных на платформе AMRexpert установили, что Ciprofloxacin обладает слабой активностью против выделенных с поверхности овощей видов Acinetobacter spp (критерии оценки чувствительности Acinetobacter. spp. установлены EUCASTv13.0(2023))

### 2.3 SNP-генотипирование изолята A. baumannii

- Провели SNP-генотипирование изолята A. Baumannii, выделенного из сельскохозяйственной продукции (огурца)

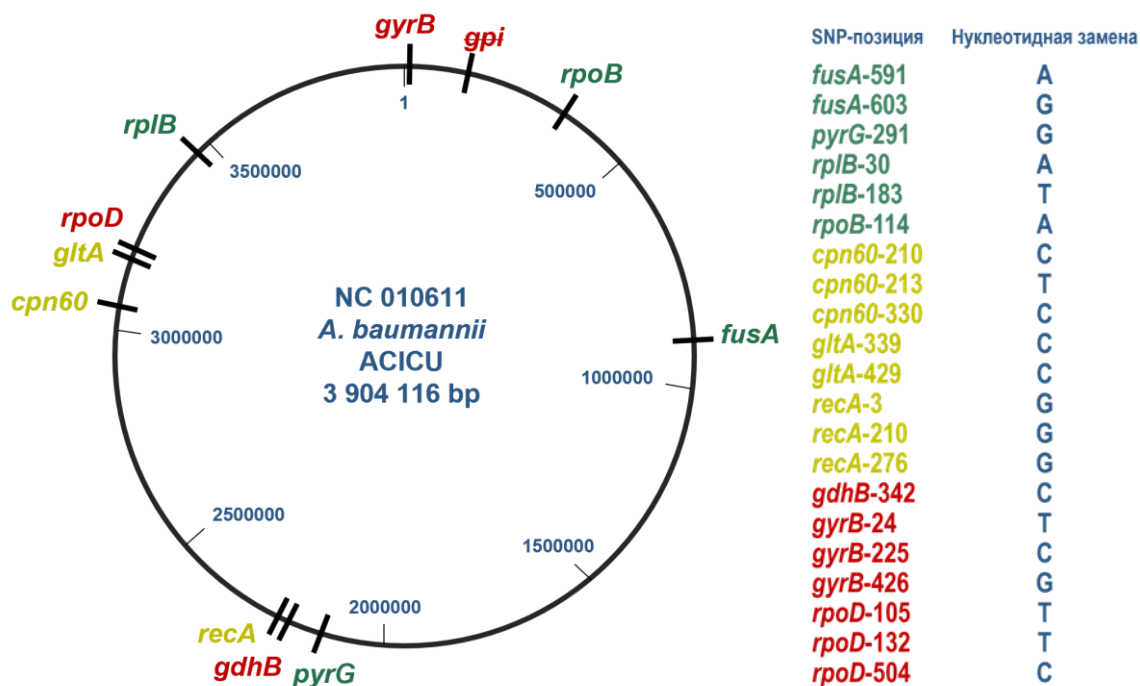


Рисунок 13. SNP-профиль изолята ENV-1

- Сравнили родственности изолята ENV-1 с распространенными генотипами в РФ в 2022 г.:

Изолят ENV-1, новый SNP-тип 153:  
CCGGGCTCTCGTTCCAGGATA

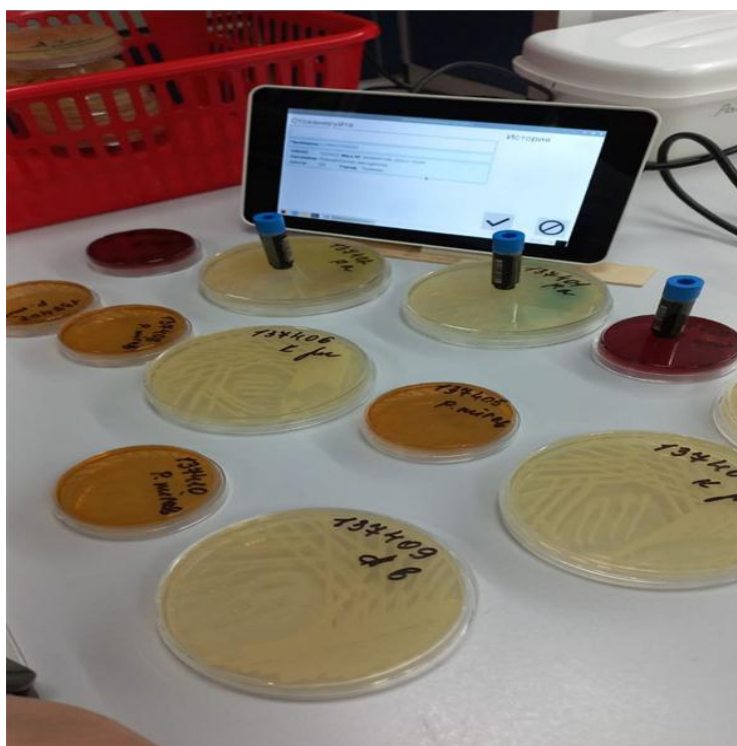
Наиболее родственные генотипы:  
(отличаются в 3 нуклеотидных позициях)

- SNP-тип 24 (singleton)  
CCGGGCTCTGGTCTAGGATA
- SNP-тип 89 (singleton)  
CCGGGCTCTGATTCCAGGATT
- SNP-тип 98 (singleton)  
TCGGGCTCTCATTCCGGGATA
- SNP-тип 147 (singleton)  
CCGGGCTCTCATTCCAGGGTT
- SNP-тип 162 (singleton)  
CCGAGCTCTCGTTTTAGGATA
- SNP-тип 163 (minor CG)  
CCGAGCTCTCATCCAGGATA

**Результат:** по результатам SNP-генотипирования генотип изолята *A. Baumannii*, выделенный из с/х продукта (огурца), сильно отличается от доминирующих клональных групп, распространенных в России в 2022 году в госпитальной среде. Полное совпадение по генотипу изолята *A. Baumannii* с другими изолятами этого же вида по международным базам данных не было установлено.

#### **2.4. Депонирование выделенных изолятов в коллекцию микроорганизмов НИИ АХ**

Все штаммы *Acinetobacter* spp., смытые с поверхности овощей и фруктов, помещены в коллекцию музея НИИ АХ как клинически значимые микроорганизмы, выделенные из окружающей среды



*Рисунок 14. Депонирование выделенных изолятов в коллекцию микроорганизмов НИИ АХ*

## Заключение

По данной работе можно сделать следующие выводы:

- С сельскохозяйственных продуктов растительного происхождения (не подвергающихся тепловой обработке) выделяются типичные гр- и гр+ микроорганизмы, обитающие в воде и почве
- Выделенные штаммы *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter courvalinii*, *Acinetobacter soli* представляют интерес ввиду клинического значения и подлежат дальнейшему исследованию
- Все штаммы *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter courvalinii*, *Acinetobacter soli* чувствительны к следующим видам антибиотиков: Amikacin, Meropenem, Ciprofloxacin, Trimethoprim/sulfamethoxazole, Imipenem, Gentamicin
- Использование платформы AMRexpert позволяет интерпретировать данные определения чувствительности в соответствие с современными стандартами и минимизировать ошибки исследования
- Разнообразие видов *Acinetobacter spp.* указывает на то, что клинически значимые микроорганизмы проникают в стационары из окружающей среды, а также вместе с пациентами, которые ими колонизированы
- Антибактериальный препарат Ciprofloxacin обладает слабой активностью против выделенных с поверхности овощей видов *Acinetobacter spp.* (по критериям оценки чувствительности EUCAST v13.0(2023))
- Генотип изолята *A. baumannii*, выделенный из с/х продукта, сильно отличается от доминирующих клональных групп, распространенных в России в 2022 году в госпитальной среде

## Список используемой литературы:

- 1) <https://biomolecula.ru/articles/chto-delat-s-rezistentnostiu-k-antibiotikam-novye-dannye-rasprostranenie-mezhdu-stranami-i-borba-s-multilekarstvennoi-ustoichivostiu> <sup>[1]</sup>
- 2) [https://antimicrob.net/wp-content/uploads/WHO-2012\\_Rezistentnost-Vozmozhnye-mery\\_russkiy.pdf](https://antimicrob.net/wp-content/uploads/WHO-2012_Rezistentnost-Vozmozhnye-mery_russkiy.pdf) <sup>[2]</sup>
- 3) <https://soz.bio/v-rossii-usilivayut-kontrol-za-antiba/> <sup>[3]</sup>
- 4) [Резистентность к антимикробным препаратам — Википедия \(wikipedia.org\)](#) <sup>[4]</sup>
- 5) <https://uteka.ru/articles/fakty/prichini-poyavleniya-ustoichivosti-k-antibiotikam/> <sup>[5]</sup>
- 6) <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259243/WHO-NMH-FOS-FZD-17.5-rus.pdf?sequence=5> <sup>[6]</sup>
- 7) <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/laws/eu/1831-2003.pdf> <sup>[7]</sup>
- 8) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28883810/> <sup>[8]</sup>