

МИКРОБНАЯ ФЛОРА ВОЗДУХА И ЕЁ УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

© 2019 Т. А. Белова¹, М. В. Протасова²

¹докт. биолог. наук,
профессор. каф. биологии и экологии
e-mail: t.belova@rambler.ru

²канд. с/х. наук,
доцент кафедры биологии и экологии
e-mail: mar.protasova2012@yandex.ru

Курский государственный университет

В статье дана оценка роста колоний микроорганизмов, циркулирующих в осенне-зимний и весенний периоды, проанализирован качественный состав колоний и их биоразнообразие, осуществлена оценка устойчивости бактерий к антибиотикам. Отмечена тенденция к изменению численности бактерий в 1м³ воздуха в зависимости от времени года и действующего антибиотика. Зафиксированы значительные изменения численности групп микроорганизмов под влиянием антибиотических средств с различным механизмом действия.

Ключевые слова: микрофлора воздуха, резистентность, антибиотики: бензилпенициллин, окситетрациклин, цефтриаксон.

Проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам является весьма актуальной на сегодняшний день, так как с течением времени они приспосабливаются к действию антибиотических веществ, приобретая новые гены резистентности. В настоящее время в медицине, промышленном производстве, сельском хозяйстве широко используются антибиотики, которых насчитывается уже около 16 тысяч [1]. В процессе применения антибиотиков выработалась устойчивость к ним у микроорганизмов. И чем продолжительнее человек использует антибиотики, тем стремительнее бактерии вырабатывают резистентность к новым препаратам. Более того, микроорганизмы становятся невосприимчивыми к некоторым антибиотикам, с которыми они прежде не сталкивались. В соответствии с этим устойчивость бактерий к антибиотикам – свойство, проявляющееся в их способности к росту и размножению в присутствии антибиотика в определенных концентрациях [1].

Целью настоящих исследований явилось изучение устойчивости к антибиотикам бактерий, циркулирующих в осенне-зимний и весенний периоды. Для достижения поставленной цели был проведен количественный анализ микрофлоры воздуха в различные времена года, выявлена динамика численности колоний микроорганизмов, проанализирован качественный состав колоний и их биоразнообразие, а также осуществлена оценка устойчивости бактерий.

Объектом исследования явилась микрофлора воздуха и её устойчивость к антибиотикам различного механизма действия. Опыт проделывали в трехкратной временной повторности: осень (октябрь), зима (февраль) и весна (май). Для закладки опыта в исследуемом помещении была использована агаризированная питательная среда, для заражения которой применяли седиментационный метод Коха. Для определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов применялся метод диффузионных дисков, которые обрабатывались препаратами антибиотиков в форме порошка для инъекций: бензилпенициллин, окситетрациклин, цефтриаксон.

Анализ микрофлоры воздуха в исследуемом помещении показывает изменения загрязнённости воздуха в зависимости от времени года.

Таблица 1

Количественный анализ микроорганизмов циркулирующих в учебной аудитории в осеннее-зимний и весенний период

Вариант опыта	Осенний период		Зимний период		Весенний период	
	Количество м/о в 1м ³ воздуха	Количество колоний	Количество м/о в 1м ³ воздуха	Количество колоний	Количество м/о в 1м ³ воздуха	Количество колоний
Контроль	15,7×10 ³	30	7,5×10 ³	14,3	15,2×10 ³	29
Бензил-пенициллин	11,4×10 ³	21,7	5,5×10 ³	10,4	14,3×10 ³	27,3
Окситетрациклин	10,1×10 ³	19	4,3×10 ³	8,2	4,7×10 ³	9

Количественный анализ микроорганизмов показывает значительное уменьшение их числа в 1м³ в зимний период. Низкая температура воздуха, наличие снежного покрова является неблагоприятной средой обитания для развития микроорганизмов в атмосфере, поэтому происходит снижение численности микрофлоры воздуха (рис. 1).

В воздухе микробы не размножаются, но могут сохранять свою жизнеспособность и болезнетворные свойства длительное время. Поэтому влажная уборка, достаточная освещенность, проветривание помещений дают положительный эффект в борьбе за чистоту воздуха. При закладке опыта в трёхкратной повторности, проведённой в различные времена года, были подсчитаны колонии микроорганизмов в чашках Петри.

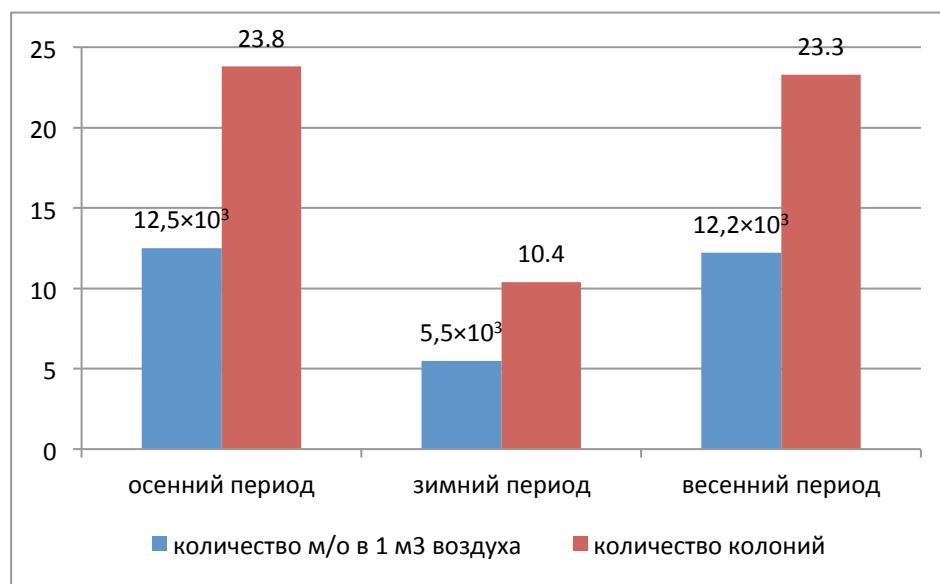


Рис. 1. Количество микроорганизмов, циркулирующих в воздухе учебной аудитории в осенний, зимний и весенний периоды

Количественный анализ микроорганизмов показывает уменьшение их числа в 1м³ воздуха в зимний период на 52,4 % и увеличение в весенний период на 50,7%. Данное явление обусловлено сменой времени года, изменением температурного

режима и увеличением численности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в осенний и весенний периоды [4].

Для отслеживания динамики численности колоний микроорганизмов под влиянием антибиотиков проводился подсчёт выросших колоний на протяжении недели. Данные занесены в таблицу 2.

Таблица 2

Динамика численности колоний микроорганизмов под влиянием антибиотиков

Вариант опыта	Количество колоний (шт.)		
	3-й день	5-й день	7-й день
Контроль	12,3	26	27,6
Бензилпенициллин	15,1	21,4	25
Окситетрациклин	7	8,4	10,2
Цефтриаксон	8,1	11	12,4

В целом динамика численности колоний микроорганизмов имеет тенденцию к повышению, что объясняет их нахождение в благоприятных условиях инкубационного периода (рис. 2).

В течение первых трёх дней зафиксирован замедленный рост колоний на всех средах с антибиотиками. На средах с окситетрациклином и цефтриаксоном наблюдается плавное и незначительное увеличение численности колоний микроорганизмов с 3-х до 7-ми суток развития. Развитие колоний на питательной среде с бензилпенициллином характеризуется скачкообразным ростом и их максимальное число проявляется на 5-е сутки инкубации. Данное явление связано с различной способностью микроорганизмов к резистентности.

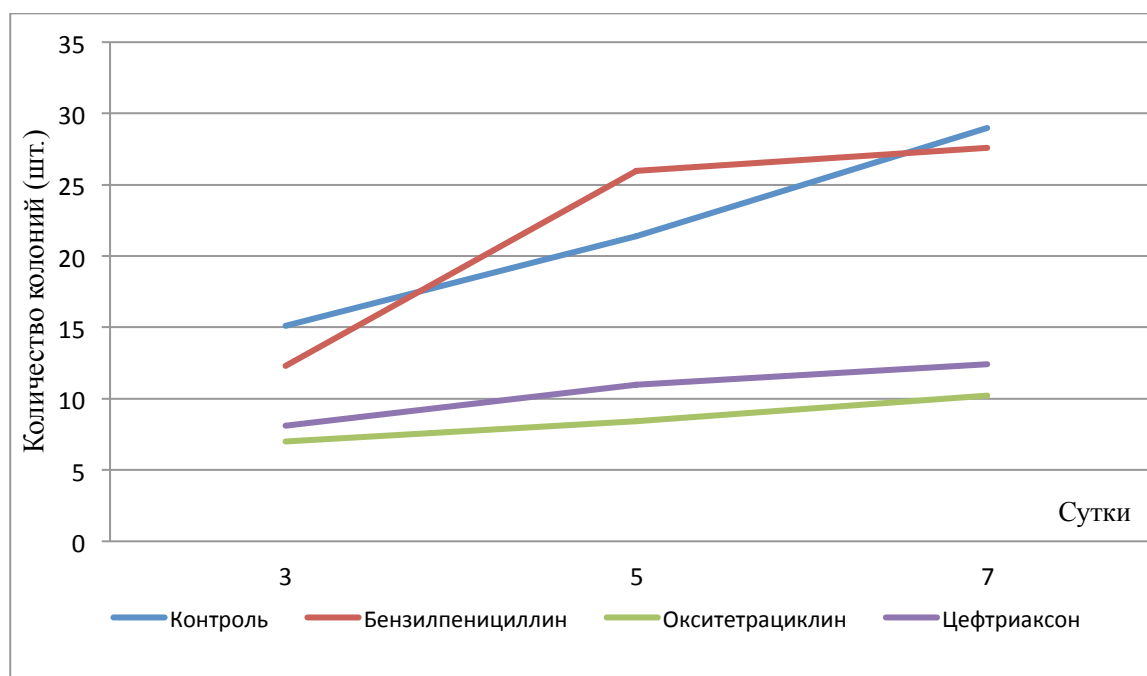


Рис.2. Динамика численности колоний микроорганизмов под влиянием различных антибиотиков

Метод приготовления фиксированных препаратов позволил определить видовую принадлежность бактерий. Осуществление качественного анализа микрофлоры показывает биологическое разнообразие колоний микроорганизмов, культивируемых

из воздушной микрофлоры учебной аудитории в осенний, зимний и весенний периоды. В исследуемых образцах были обнаружены следующие группы микроорганизмов:

1) стрептококки (*Streptococcus*) – род грамположительных бактерий шаровидной формы (размер 0,5–1 мкм), располагающихся в виде цепочек. Образуют гладкие бесцветные или желтые колонии;

2) стафилококки (*Staphylococcus*) – род бактерий правильной сферической или шарообразной формы, размер которых варьируется от 0,5 до 1,5 мкм. В мазках располагаются скоплениями, часто гроздевидными. Относятся к грамположительным неподвижным бактериям. Они образуют выпуклые, ровные непрозрачные колонии средней величины белого, лимонно-желтого или золотистого цвета;

3) род сарцина (*Sarcina*) – бактерии шаровидной формы (диаметром 0,8–3 мкм). Сарцины являются грамположительными, неподвижными, обычно неспороносными и непатогенными микроорганизмами. На плотных средах образуют круглые гладкие красные колонии, что напрямую связано с наличием в клетках пигмента каротина;

4) кишечная палочка (*Escherichia coli*) – вид грамотрицательных палочковидных бактерий. Как и стафилококковые, образуют желтые и белые колонии, реже колонии розового цвета;

5) пенициллиум (*Penicillium*) – один из наиболее широко распространённых в мире родов грибов, представители которого присутствуют в самых различных местах — в почве, на растениях, в воздухе, в домах, на пищевых продуктах. Колонии имеют вид голубого либо зеленого налета плесени;

6) мукор (*Mucor*) – род низших плесневых грибов, относящихся к классу зигомицетов, который включает около 60 видов. Его мицелий представляет собой переплетение гиф беловатого цвета и поэтому его колонии выглядят как пушистый белый налет. Спорангии мукора имеют черный оттенок, поэтому через некоторое время белая плесень становится черной.

Для изучения биоразнообразия микрофлоры учебной аудитории был проведен качественный анализ выросших колоний микроорганизмов, культивируемых в чашках Петри. Для выявления зависимости численности колоний определенных видов микроорганизмов от периода был проведен подсчет колоний в контрольном варианте (табл. 3).

Таблица 3

Биологическое разнообразие микроорганизмов воздушной микрофлоры учебной аудитории в осенний, зимний и весенний периоды

Группы микроорганизмов	Осенний период	Зимний период	Весенний период
	Количество колоний микроорганизмов		
<i>Streptococcus</i>	16,3%	31%	11,3%
<i>Staphylococcus</i>	12%	16,5%	12,4%
<i>Sarcina</i>	6,4%	–	6,8%
<i>Escherichia coli</i>	29%	–	18,9%
<i>Penicillium</i>	21%	33,5%	21%
<i>Mucor</i>	15,3%	19%	29,6%

На основании полученных результатов выяснилось, что биологическое разнообразие микроорганизмов воздушного пространства аудитории напрямую зависит от времени года. Интерпретируя полученные данные при оценке биологического разнообразия воздушной микрофлоры учебной аудитории, провели сравнительный анализ данного критерия во время осеннего, зимнего и весеннего периодов (рис. 3).

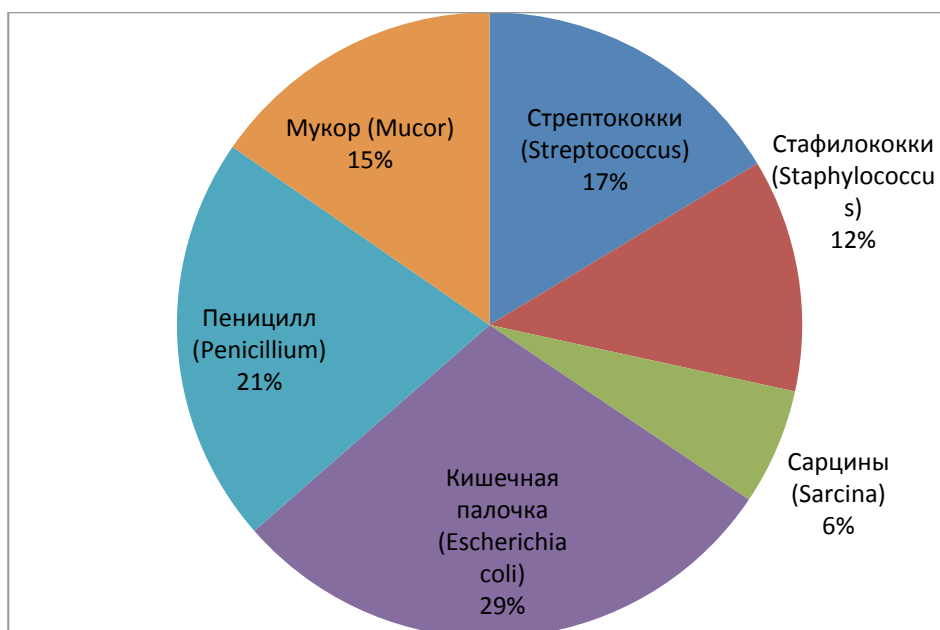


Рис. 3. Оценка биологического разнообразия воздушной микрофлоры учебной аудитории

Отмечено, что самую большую численность, выраженную в процентах, имеют колонии пенициллиума, зафиксированные в осеннее время года (21%), и мукора – в весеннее время (29,6%). Однако для решения поставленной задачи проводится исследование бактерий, у которых имеются мишени для действия антибиотиков. В зимний период произошло увеличение количества колоний бактерий: стрептококков на 47,5%, стафилококков на 27,3%. Это связано с редким проветриванием и увеличением числа носителей инфекций, находящихся в помещении, в течение дня. Отсутствие сарцин в зимнее время связано с восприимчивостью к температурному режиму, кишечная палочка также не была обнаружена.

Под влиянием антибиотиков происходит подавление роста и развития микроорганизмов, изменяется численность их колоний в результате угнетающего действия (табл. 4).

Таблица 4

Изменение количества колоний микроорганизмов под влиянием антибиотиков

Группы микроорганизмов	Осенний период				Зимний период				Весенний период			
	конт	бен	окс	цеф	конт	бен	окс	цеф	конт	бен	окс	цеф
Стрептококки	9,5	6,25	4,2	8,25	8,3	7,25	5,5	4,5	7	6,2	2,5	8,2
Стафилококки	6,5	4	4,5	7,4	6	3,15	2,7	4,1	8	7	3,2	7,1
Сарцины	2,5	1,5	–	3,5	–	–	–	–	3,5	3,3	1,5	1,1
Кишечная палочка	11,5	9,95	10,3	5,25	–	–	–	–	10,5	10,8	1,8	11,6
Общее число колоний (шт.)	30	21,7	19	24,4	14,3	10,4	8,2	8,6	29	27,3	9	28
Среднее	7,5	5,43	4,75	6,1	3,58	2,6	2,05	2,15	7,25	6,83	2,25	7

При анализе влияния антибиотиков на представителей бактерий различных групп было замечено значительное снижение количества колоний в зимний период в связи с понижением температур, наличием снежного покрова и, как следствие, уменьшением циркуляции пылевых частиц в воздухе, которые являются субстратом для микроорганизмов.

В варианте опыта с бензилпенициллином во время осеннего периода численность стрептококков по сравнению с контрольным вариантом уменьшилась на 34,3%, а стафилококков – на 38,5%. Это связано со способностью бензилпенициллина к блокированию ферментов, участвующих в синтезе пептидогликана, что приводит к существенному уменьшению числа колоний грамположительных бактерий. Численный показатель кишечной палочки, имеющей врожденную устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда, в осенний период ненамного изменился по сравнению с контрольным вариантом – всего на 13%. Однако кишечная палочка проявила чувствительность к цефтриаксону, что особенно заметно в осенний период; это связано с широким спектром действия данного антибиотика.

Существенное влияние на снижение количества колоний бактерий оказывал окситетрациклин. В осенний период численность колоний в контрольном варианте составляла 30 шт., при внедрении дисков с антибиотиком общая численность колоний снизилась до 19 шт. Данное явление свидетельствует о снижении численности колоний на 36,7%. Также под его действием общая численность колоний в весенний период по сравнению с зимним увеличилась всего на 9%.

После окончания инкубации чашки Петри помещали на ровную поверхность так, что бы свет падал на них под углом 45° (учет в отраженном свете). Формирование зон задержки роста происходит путём диффузии антибиотика в питательную среду при осуществлении дискового метода. Диаметр зон подавления измерялся с точностью до 1 мм. При их измерении ориентировались на зону полного подавления видимого роста микроорганизма.

С помощью метода диффузионных дисков была проведена оценка чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, главным критерием которой является зона подавления роста колоний микроорганизмов (табл. 5).

Таблица 5

Оценка чувствительности выявленных групп микроорганизмов к антибиотикам

Антибиотик	Зона подавления роста микроорганизмов (мм)			Присутствующие группы бактерий
	Осенний период	Зимний период	Весенний период	
Бензилпенициллин	1,5	1,4	1,4	Streptococcus, Staphylococcus, Sarcina, Escherichia coli
Окситетрациклин	3,3	3,37	2,88	
Цефтриаксон	2,25	2,12	2,18	

В зависимости от периода зона подавления антибиотика имела незначительные изменения, которые лежали в пределах ошибки опыта.

В результате применения диско-диффузионного метода и анализа научной литературы выяснилось, что кишечная палочка является умеренно резистентной к бензилпенициллину и окситетрациклину. Остальные шаровидные бактерии (стафилококки, стрептококки, сарцины) являются чувствительными к действию всех исследуемых антибиотиков, в особенности к окситетрациклину, что обусловлено его большей зоной подавления на фоне других антибиотиков. При этом была выявлена зона подавления каждого из антибиотиков, что является важным критерием антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Таким образом, количественный анализ воздушной микрофлоры учебной аудитории показал тенденцию к изменению численности бактерий в 1 м³ воздуха в зависимости от времени года и действующего антибиотика. Данное явление обусловлено существенным изменением температурного режима, что создает благоприятные условия для роста и развития воздушной микрофлоры в весенний и

осенний периоды. При анализе влияния антибиотиков на представителей бактерий различных групп было зафиксировано значительное изменение численности стрептококков и стафилококков под влиянием бензилпенициллина, что связано с механизмом действия антибиотика по отношению к грамположительным бактериям. Наблюдалось несущественное уменьшение численного показателя кишечной палочки по сравнению с контрольным вариантом, что объясняется её врожденной устойчивостью к антибиотикам пенициллинового ряда.

Изучение биологического разнообразия микрофлоры воздуха показало на наличие в воздушной среде стрептококков, стафилококков, сарцин, кишечной палочки, пенициллиума, мукора. При этом обнаружено увеличение численности колоний стрептококков, стафилококков во время зимнего периода. В результате применения дискового метода выяснилось, что кишечная палочка является умеренно резистентной к бензилпенициллину и окситетрациклину. Шаровидные бактерии являются чувствительными к действию всех исследуемых антибиотиков, в особенности к окситетрациклину, что выражено его большей зоной подавления на фоне других антибиотиков.

Библиографический список

1. *Березняков И.Г.* Резистентность к антибиотикам: причины, механизмы, пути преодоления / *Клин. антибиотикотерапия.* 2001. С. 32–34.
2. *Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. М.: Изд-во МГУ. 2003. 464 с.
3. *Егоров И.С.* Основы учения об антибиотиках: учеб. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. С. 528–540.
4. *Краснопивцева А.Н., Белова Т.А.* Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, циркулирующих в осенний и зимний период // *Совершенствование методологии познания в целях развития науки: сб. ст. по итогам Междунар. науч.-практич. конф. Челябинск, 26 мая 2018 г.* Уфа: ООО «Агентство международных исследований», 2018. С. 8–11.
5. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук М.Л.* Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.