ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ И ТВОРЧЕСКИХ РАБОТ МОЛОДЁЖИ

«МЕНЯ ОЦЕНЯТ В XXI ВЕКЕ»

Направление: Биология

Тема: «Антибактериальная активность экстрактов можжевельников в отношении коллекционного штамма *Escherichia coli*»

Соискатель: Сдобнов Александр Андреевич,
ученик 9 класса МБОУ «Школа-лицей»
№3 им.А. С. Макаренко г. Симферополь,
воспитанник ГБОУ ДО РК «МАН «Искатель»

Научный руководитель:
Скопинцева Наталья Кимовна,
педагог дополнительного образования
ГБОУ ДО РК «МАН «Искатель»

Научный консультант:
Сидякин Андрей Иванович
к.б.н., доцент кафедры ботаники,
физиологии растений и биотехнологий
Института биохимических технологий,
экологии и фармации
КФУ им. В. И. Вернадского

Место выполнения работы:
ГБОУ ДО РК «МАН «Искатель»
ИБТЭФ КФУ им. В.И. Вернадского

Аннотация

Антибактериальная активность экстрактов можжевельников в отношении коллекционного штамма *E. coli.*

Данная работа посвящена исследованию антибактериальной активности экстрактов растительной биомассы можжевельников из Ботанического сада Крымского федерального университета им. В.И.Вернадского в отношении коллекционного штамма *E. coli.***Актуальность** работы обусловлена повышением резистентности микроорганизмов ко многим антибиотикам, что вызывает необходимость разрабатывать новые антимикробные препараты и исследовать растения, обладающие антибактериальной активностью. **Новизна** исследования: впервые была подробно изучена антибактериальная активность экстрактов можжевельников трех видов из Ботанического сада им. В.Н. Багрова КФУ по отношению к типовому штамму E. coli.

Цель работы: исследовать антибактериальную активность экстрактов разной концентрации можжевельников*: Juniperus virginiana L., Juniperus sabina L., Juniperus oxycedrus L.* в отношении коллекционного штамма E. coli. **Задачи**: 1) приготовить экстракты растительного материала; 2) определить чувствительность кишечной палочки к экстрактам можжевельников (Виргинского, Казацкого и Колючего) к растворителю и стандартному антибиотику - тетрациклину; 3) осуществить учет и интерпретацию полученных результатов; 4) вычислить эффективность действия экстрактов можжевельников; 5) разработать предложения по дальнейшему развитию темы научного исследования. Работа была выполнена на базе ГБОУ ДО РК «МАН «Искатель», практическую часть исследования проводили в лаборатории кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации КФУ им. В. И. Вернадского.

Методы исследования: морфологический и культуральный методы идентификации микроорганизмов, диско-диффузионный метод оценки антибиотикочувствительности, статистический метод. Экспериментальная часть исследования была осуществлена в лаборатории ИБТЭФ КФУ им. В.И. Вернадского.

Определение антибиотикочувствительности включало в себя этап приготовления питательной среды, приготовление инокулюма, инокуляцию, инкубацию и аппликацию дисков, учет и интерпретацию полученных результатов.

Выводы и полученные результаты:

1. проанализирована антибактериальная активность экстрактов трех видов можжевельников разной концентрации в отношении коллекционного штамма E. coli;
2. определено, что относительная эффективность экстрактов можжевельников различных видов сильно зависит от концентрации экстрактов, и вида используемого в эксперименте растения;
3. выявлена наибольшая эффективность подавления штамма кишечной палочки при использовании экстракта из материала женских растений можжевельника виргинского в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сырого растительного вещества;
4. доказана перспективность исследований чувствительности бактерий к экстрактам можжевельников различных видов для решения вопросов антибиотикорезистентности;
5. полученные данные указывают на возможность разработки антибиотических препаратов на основе экстрактов можжевельника.

Содержание

Введение……...4
Раздел 1. Обзор литературы…….....5
1.1. Антибиотики…...…….....5
1.2. Фитонциды…….....5
1.3. Состав и свойства можжевельника……..……6

Раздел 2. Материалы и методы исследования……7
2.1.Материал исследования……7
2.1.1. Характеристика растительного материала…….....7
2.1.2. Изолят E. coli…… 8
2.2.Методы исследования……...8
2.2.1. Диско-диффузионный метод определения чувствительности к вытяжкам из растительного материла……..……8
2.2.2.Выделение чистых культур…….....9
Раздел 3.Результаты исследований…….....10
3.1.Приготовление растительных экстрактов……..10
3.2.Оценка антибиотикочувствительности……..10
3.3.Статистическая обработка данных……13
Выводы……...15
Заключение……16
Список используемой литературы……17
Приложение 1.……...18
Приложение 2. ……..19
Приложение 3. …….....20
Приложение 4. ……..20
Приложение 5. ……..21
Приложение 6. ……..21
Приложение 7. ……..22
Приложение 8. ……..22
Приложение 9. ……..23
Приложение 10. ……23
Приложение 11. ……24
Приложение 12. ……25

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам представляет собой комплексный биологический феномен, обусловленный адаптивными изменениями на генетическом уровне различных патогенов, в том числе бактерий, грибковых организмов, паразитарных форм и вирусов. Ученые Адамс Р.П. [16], Кайзер А.А.[4], Турова Л.Д.[13], Токин Б.П.[12] посвятили свои работы исследованию растений, которые обладают антибактериальной активностью.

Актуальность работы обусловлена повышением резистентности микроорганизмов ко многим антибиотикам, что вызывает необходимость разрабатывать новые антимикробные препараты и исследовать растения, обладающие антибактериальной активностью.

Новизна исследования: впервые была подробно изучена антибактериальная активность экстрактов можжевельников трех видов из Ботанического сада им. В.Н. Багрова КФУ по отношению к типовому штамму E. coli.

Цель работы: исследовать антибактериальную активность экстрактов разной концентрацииможжевельников*: Juniperus virginiana L., Juniperus sabina L., Juniperus oxycedrus L.* в отношении коллекционного штамма E. coli.

Задачи:

1) приготовить экстракты растительного материала;
2) определить чувствительность кишечной палочки к экстрактам можжевельников (Виргинского, Казацкого и Колючего) к растворителю и стандартному антибиотику - тетрациклину;
3) осуществить учет и интерпретацию полученных результатов;
4) вычислить эффективность действия экстрактов можжевельников;
5) разработать предложения по дальнейшему развитию темы научного исследования.

Объект исследования: фитонцидная активность растений.

Предмет исследования: антибактериальная активность экстрактов можжевельников в отношении штамма E. coli.

Материал исследования: растительный материал трех видов можжевельников, представленный незрелыми шишкоягодами и побегами прироста настоящего года исследования, собранными в июле 2025 года в Ботаническом саду им. В.Н. Багрова, а также типовой штамм *E. coli* из коллекции Института биохимических технологий, экологии и фармации Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского.

Методы исследования: морфологический и культуральный методы идентификации микроорганизмов, диско-диффузионный метод оценки антибиотикочувствительности, статистический метод.

Работа была выполнена на базе ГБОУ ДО РК «МАН «Искатель», практическую часть исследования проводили в лаборатории кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации КФУ им. В. И. Вернадского.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Антибиотики.

В связи с выявлением устойчивости микроорганизмов ко многим антибиотикам, становятся актуальными исследования, посвященные растениям, обладающим антибактериальной активностью. Антибиотики – «специфические химические вещества, образуемые микроорганизмами, способные в малых количествах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы и на клетки злокачественных опухолей. К антибиотикам, в широком смысле, относят также антимикробные вещества тканей высших растений (фитонциды) и животных. Синтез антибиотиков является выражением активного антагонизма микробов–антагонистов. Первый антибиотик–пенициллин был открыт А. Флемингом в 1929 г., термин предложил в 1942 г. З. Баксман»[14, с. 19].

1.2. Фитонциды.

Особое явление в растительном мире – фитонцидные свойства растений – впервые обнаружено в 1928-1930 гг. Б.П. Токиным [11]. Фитонциды «имеют значение для жизни самих растений и наряду со многими другими свойствами растений защищают их от вредных бактерий, грибков, простейших организмов и тех или иных многоклеточных организмов, особенно насекомых»[11,с. 19-20].

Необходимо помнить о том, что фитонциды любого растения обладают антибиотическими свойствами, но далеко не всякий антибиотик является фитонцидом, то есть играет защитную для растения роль в борьбе против микроорганизмов и вредных для него многоклеточных организмов [11, с. 19-20].

Нам известны сотни тысяч видов, разновидностей, сортов растений, и все они обладают фитонцидными свойствами. Это явление характерно для растительного мира в целом. Одни растения вырабатывают преимущественно сильно летучие фитонциды, другие — малолетучие; фитонциды разных растений имеют неодинаковую мощность, различен и их химический состав. Фитонциды одних растений обладают бактерицидными свойствами, то есть могут убивать бактерии. Фитонциды других растений обладают бактериостатическими свойствами, то есть не убивают, а только задерживают рост и размножение микроорганизмов[11, с. 20].

Фитонциды различных растений — это не одно какое-либо вещество, а множество самых разнообразных. Фитонциды лука убивают вне организма туберкулёзную палочку и в то же время бессильны в отношении некоторых бактерий и грибков, вызывающих заразные заболевания у лука. Фитонциды прибрежно-водного злакового растения манника убивают некоторые многоклеточные организмы, например мух и слепней, в течение секунд, а простейших — лишь через многие часы[11, с. 21].

Фитонциды – биологически активные вещества, синтезируемые растениями, убивающие или подавляющие рост и развитие др. организмов (главным образом микроорганизмов) [14, с. 155]. Растительные материалы, богатые полифенольными соединениями, используются для лечения бактериальных заболеваний в течение многих столетий.

1.3. Состав и свойства можжевельника.

Род Juniperus L. включает в себя около 70 видов и 27 разновидностей [16]. Можжевельники относятся к полиморфным видам, для которых характерна большая изменчивость многих морфологических признаков их генеративных и вегетативных органов. Это объясняется по мнению Князевой С.Г. [5] весьма обширными ареалами, где отдельные популяции попадают в различные условия произрастания и большой морфологической и физиологической пластичностью, характерной для видов рода можжевельник в силу их относительной эволюционной молодости.

Ученые Шутова А.Г., Спиридович И.М., исследуя состав эфирных масел представителей рода Juniperus L., определили следующее: «Все изученные объекты содержали большое количество сабинена (за исключением J. rigida), сравнительно низкое количество камфена. Сабинен у 6 видов можжевельников являлся одним из доминирующих компонентов, причем у двух видов (можжевельника скального и можжевельника горизонтального) он составлял более 50% от общего содержания компонентов. Лимонен преобладал также в 6 случаях, а борнилацетат был одним из основных компонентов у трех видов можжевельников» [15, с.129].

Ученые Кайзер А.А.[4], Турова Л.Д. [13], изучали компоненты, содержащиеся в можжевельнике обыкновенном. В плодах обнаружены сахара, смолистые вещества, терпены и эфирное масло. Муравьиная кислота в настоях и отварах можжевельника оказывает противомикробное действие. Уксусная кислота в составе плодов нормализует кровяное давление, а яблочная кислота влияет на обменные процессы и улучшает пищеварение в организме человека.

В ходе исследования антимикробной активности экстрактов ягод и хвои можжевельника на тестерные штаммы микроорганизмов, Иванченко О.Б. и Онуфриенко Г.С [3] определили, что водный экстракт ягод можжевельника в концентрации 100 г/100 мл и экстракты хвои можжевельника в обеих исследуемых концентрациях подавляют рост клеток Escherichia coli.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальную часть работы выполняли на базе кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского в 2025 году. Автор выражает благодарность к.б.н., доценту кафедры Сидякину А.И. за высококвалифицированные консультации при выполнении исследования.

2.1. Материал исследования

Материал исследования - незрелые шишкоягоды и побеги прироста трех видов можжевельников *(Juniperus virginiana L., Juniperus sabina L., Juniperus oxycedrus L.)* из Ботанического сада им. В.Н. Багрова КФУ и типовой штамм *E. coli* из коллекции Института биохимических технологий, экологии и фармации КФУ им. В. И. Вернадского.

2.1.1. Характеристика растительного материала.

Незрелые шишкоягоды и побеги прироста были собраны в июле 2025 года в Ботаническом саду им. В.Н. Багрова. Характеристика материала представлена в **таблице 1.** («Список растительного материала можжевельников из ботанического сада КФУ»).

Систематическое положение объектов исследования в соответствии с определителем высших растений Крыма под редакцией Н.И. Рубцова[9].

Можжевельник виргинский
Домен: Эукариоты – Eukaryota Tomas
Царство: Растения – Plantae Haeckel
Отдел: Хвойные – Pinophyta Cronquist, Takht.&Zimmerm.ex Reveal,
Класс: Хвойные – Pinopsida Burnett
Порядок: Сосновые – Pinales Gorozh.
Семейство: Кипарисовые – Cupressaceae Gray
Род: Можжевельник – *Juniperus* L.
Вид: Можжевельник виргинский – *Juniperus virginiana* GreyOwl

Можжевельник казацкий
Домен: Эукариоты – EukaryotaTomas
Царство: Растения – Plantae Haeckel
Отдел: Хвойные – Pinophyta Cronquist, Takht.&Zimmerm.ex Reveal,
Класс: Хвойные – Pinopsida Burnett
Порядок: Сосновые – Pinales Gorozh.
Семейство: Кипарисовые – Cupressaceae Gray
Род: Можжевельник – *Juniperus* L.
Вид: Можжевельник казацкий – *Juniperus Sabina*L.

Можжевельникколючий
Домен: Эукариоты – Eukaryota Tomas
Царство: Растения – Plantae Haeckel
Отдел: Хвойные – Pinophyta Cronquist, Takht.&Zimmerm.exReveal,
Класс: Хвойные – Pinopsida Burnett
Порядок: Сосновые – Pinales Gorozh.

Семейство: Кипарисовые – Cupressaceae Gray
Род: Можжевельник – *Juniperus* L.
Вид: Можжевельник колючий – *Juniperusoxycedrus* L.

2.1.2. Изолят E. coli.

Культура *E. coli* из коллекции Института биохимических технологий, экологии и фармации КФУ им. В. И. Вернадского, выделенная от клинически здорового пациента в 2024 году. Систематическое положение объекта исследования [10]:

Царство *Bacteria*;
Тип *Proteobacteria*;
Класс *Gamma Proteobacteria*;
Порядок *Enterobacteriales*;
Семейство *Enterobacteriaceae*;
Род *Escherichia;*
Вид *Escherichiacoli*.

E. coli представляет собой мелкие (длиной 2 - 3 мкм., шириной 0,5 - 0,7 мкм.) грамотрицательные палочки с закруглёнными концами. В мазках клетки располагаются беспорядочно, не способны к спорообразованию, подвижны за счёт наличия перетрихиальных жгутиков [6]. Исследуемые изоляты факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых питательных средах при 37°С и pH среды 7,2 – 7,8. На МПА образуют круглые, 2-4 мм в диаметре, мутноватые, выпуклые влажные колонии с ровным краем с гладкой блестящей поверхностью. На МПБ дают равномерное помутнение и небольшой осадок нередко, образуют пленку. Культуры, имеющие микрокапсулу, растут в виде слизистых колоний. На среде Эндолактозоположительные изоляты дают малиново-красные колонии с металлическим блеском или без него.

2.2. Методы исследования

Для приготовления экстрактов из растительного сырья можжевельников был выбран метод мацерации. Мацерация (от лат. macerare – намачивать) – наиболее известный метод экстрагирования, при котором, как указывает Дубашинская Н.В. [1], лекарственное растительное сырье с определенной измельченностью заливают рассчитанным количеством экстрагента и настаивают необходимое количество времени, затем извлечение сливают и отстаивают 2 – 5 суток при температуре не выше 80 С [1]. Автором метода мацерации в микробиологии является биохимик, профессор МГУ Александр Николаевич Лебедев (1881, Москва – 3 июня 1938, Москва). Данный метод был разработан в 1911 году.

2.2.1. Диско-диффузионный метод определения чувствительности к вытяжкам из растительного материла.

Для проведения оценки чувствительности штаммов *E. coli* к вытяжкам из растительного сырья можжевельников был выбран диско-диффузионный метод по МУК 4.2. 1890-04[7]. Его широко применяют в бактериологических лабораториях для определения антибиотикочувствительности. Благодаря наличию следующих преимуществ: 1) применим для многих антибактериальных препаратов; 2) подходит для микроорганизмов с разными

питательными потребностями; 3) метод является доступным, так как не требует больших затрат. Оценка антибиотикочувствительности подразумевает под собой выполнение следующих этапов: приготовление питательной среды; приготовление инокулюма; инокуляция; инкубация; учет и интерпретация полученных результатов. Но перед проведением данной работы необходимо провести очистку культур.

2.2.2. Выделение чистых культур.

Изначально культуры реактивируют из системы хранения при температуре -80 ^{o}C, и высевают изучаемые культуры на селективные твёрдые питательные среды, рекомендованные в микробиологической практике с целью получения чистых культур [2].

Получение чистых культур микроорганизмов – обязательный предварительный этап любого микробиологического исследования. Выделению чистых культур предшествует процесс культивирования, в ходе которого используются специальные методы, направленные на отделение конкретных микроорганизмов от посторонней микрофлоры. Одним из общепризнанных и простых методов, используемых для изоляции чистых культур, является метод посева штрихом. Суть метода заключается в последовательном механическом разделении микроорганизмов на твердой питательной среде с целью получения индивидуальных изолированных колоний.

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Приготовление растительных экстрактов.

При приготовлении растительных экстрактов с целью предотвращения потери возможных антибактериальных соединений летучей природы (эфирных масел) использовали навеску растительной массы (по сырому веществу, исходной влажности), которую измельчали в ступке с диметилсульфоксидом, с таким расчетом, чтобы получить содержание конечного экстракта от 3000 до 3 мкг растительной биомассы на 1 диск.

В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид, так как этот растворитель является не летучим, не токсичным для бактериальных клеток, хорошо подходит для извлечения из растительного сырья полного комплекса биологически активных веществ, включая смолистые вещества, эфирные масла, жиры, фенольные соединения и пигменты, что позволяет его использовать в качестве универсального растворителя при определении комплексной оценки биологической активности как химических так и биологических факторов.

Для этого, зная, что один диск поглощает 12,8 мг растворителя (определяли экспериментально весовым методом), навеску растительного материала равную 3,0 грамма взятую из молодых побегов текущего года прироста или иных частей растений переносили в предварительно простерилизованную сухим жаром ступку, приливали немного чистого диметилсульфоксида (ДМСО, ТУ 6-09-3818-88), растирали до гомогенного состояния, приливали навеску ДМСО до конечной массы 12,8 г; переносили в стерильные пенициллиновые флаконы и оставляли на 72 часа для экстракции биологически активных компонентов.

Перед исследованием антибактериальной активности готовили ряд разведений, с таким расчетом, чтобы получить конечную концентрацию растительной массы на 1 диск от 3000 до 3,0 мкг. Способы разведений представлены в **таблице 2.**

В работе использовали стандартные микробиологические приемы [7; 2; 8]. Стерилизацию посуды осуществляли путем обработки сухим жаром при 160 ^{o}C в течение 2 часов. Питательные среды и вспомогательные материалы стерилизовали автоклавированием при 112 ^{o}C и избыточном давлении насыщенного пара в автоклаве Clinoclav AH-11-N (Raypa, Испания).

3.2.Оценка антибиотикочувствительности.

Данный процесс подразумевает под собой выполнение следующих этапов: приготовление питательной среды; приготовление инокулюма; инокуляция; инкубация; учет и интерпретация полученных результатов.

Подготовка питательной среды. Подготовка питательной среды является важным этапом при проведении исследований, направленных на оценку чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Для качественного исполнения такого рода испытаний необходимым условием является выбор стандартной питательной среды, отвечающей строгим микробиологическим нормам. В проведённом исследовании для проверки антибиотикочувствительности использовалась специальная питательная среда – агар Мюллера-Хинтона без добавления плазмы крови (**фото3**). Контроль среды осуществлялся по МУК 4.2.2316-08. Выбор именно этой среды объясняется её универсальностью и соответствием международным протоколам по проведению тестов

антибиотикочувствительности. Приготовление питательной среды осуществили строго в соответствии с рекомендациями производителя. Чтобы обеспечить надлежащее качество среды, приготовленный агар подвергли автоклавированию. Только после завершения процесса стерилизации и охлаждения среды до 40-45 °С, агар залили в стандартные чашки Петри. Заливка агара должна проводиться равномерно и тонким слоем, толщина которого регламентирована нормами и составляет 4,0 ± 0,5 мм. Этого удается достичь, заполняя каждую чашку объемом ровно 20 мл жидкого агара, соответствующего диаметру чашки Петри в 90 мм. Наполненные чашки Петри с залитой средой устанавливают на горизонтальную поверхность, оставляя их для полного застывания при комнатной температуре. Крайне важно соблюдать данное условие, так как неправильная установка или неровная поверхность могут повлиять на толщину агарового слоя и ухудшить качество результатов исследования. Готовые чашки с застывшей питательной средой желательно использовать незамедлительно после высыхания, так как хранение может негативно сказаться на физико-химических характеристиках среды и искажать итоговые показатели антибиотикочувствительности.

Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма) из агаровой культуры. Подготовка инокулюма является ключевым этапом любого микробиологического исследования. Для осуществления правильного подбора инокулюма первоначально отбирают чистые изолированные колонии микроорганизмов с поверхности твердых питательных сред. Микроорганизмы, отобранные таким образом, гарантированно принадлежат одному виду и обладают едиными биологическими характеристиками, что существенно упрощает последующий анализ. Чтобы подготовить подходящую суспензию, необходимо взять чистую бактериологическую петлю диаметром 2,0 мм и аккуратно перенести материал, полученный из выбранной колонии, в колбу с небольшим количеством питательного бульона Мюллера-Хинтона, оставить на 12-18 часов на качалке для получения суспензии, которая должна соответствовать стандарту плотности Макфарланда 0,5. Стандарт Макфарланда определяет точное соотношение между плотностью суспензии и числом микроорганизмов, содержащихся в ней. И которая соответствует содержанию не более $1,5 \times 10^8$ КОЕ, что является идеальным показателем для большинства анализов, проводимых в микробиологии. Использовать свежую суспензию необходимо своевременно, так как длительность хранения способна оказать негативное воздействие на точность дальнейшего анализа (**фото 4**).

Инокуляцию проводили с помощью стерильного ватного тампона (**фото 5**). Тампон погружали в пробирку с бактериальной суспензией, затем избыток инокулята устраняли с помощью придавливания тампона о стенки колбы. Инокуляцию осуществлялась штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Для проведения теста необходимо использовать только чистые 18-24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на плотной неселективной питательной среде.

Аппликация дисков и инкубация. Для работы были использованы стандартизированные качественные диски из фильтровального картона (ГОСТ 6722-75) диаметром 6 мм и в качестве контроля – диски со стандартным антибиотиком пропитанные АМП, производитель – ООО «НИЦФ». Аппликация дисков на поверхность питательной среды проводится немедленно после завершения инокуляции – не позже 15 минут. При соблюдении указанного временного интервала удаётся сохранить оптимальное состояние среды и предупредить деградацию антибиотика. Непосредственная аппликация дисков осуществляется с помощью стерильного анатомического пинцета, что обеспечивает соблюдение принципов асептики и предотвращает контаминацию. При расположении дисков на поверхности питательной среды следует руководствоваться нормативами:

минимальное расстояние от краев чашки до диска должно составлять 15–20 мм, аналогичная дистанция поддерживается и между соседними дисками. Таким образом, на одну чашку Петри допустимо размещать не более шести антибактериальных дисков. Контакт дисков с питательной средой должен быть полным и равномерным, что достигается лёгким нажатием пинцета сверху. Качественный контакт диска с поверхностью среды гарантирует полноценное диффузионное проникновение антибиотика и формирование правильных зон задержки роста. Сразу после размещения дисков чашки Петри переворачивают вверх дном и инкубируют в соответствующем температурном режиме (35 ± 1) °С в течение 24 часов (**фото 6**). Создание стабильных условий инкубации обеспечивает репрезентативность экспериментальных данных и позволяет объективно интерпретировать полученные результаты.

Определение антибиотикочувствительностиДДМ. Образование зоны подавления роста тест-культур в микробиологическом исследовании обусловлено двумя ключевыми факторами: способностью антимикробного препарата диффундировать в толщу питательной среды и чувствительностью микроорганизмов к указанному антибиактриальному препарату. Если бактерия оказывается чувствительной к антибиотику, она прекращает своё деление и рост в радиусе действия активного ингредиента, формируя зону задержания роста, ограниченную пределами диффузии антибиотика в агар. Перед нанесением дисков засеяли питательную среду газоном тест-культуры. Газон формируется равномерным распределением бактериальной суспензии на агаре, что позволяет оценить реакцию всех клеток культуры на антимикробный препарат одновременно. После засевания среды газоном приступают к наложению бумажных дисков, изготовленных из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм и пропитанных растворами растительных экстрактов.

После инкубации производится тщательный учет и анализ полученных результатов. Основным параметром, на основании которого оценивается чувствительность тест-объекта к экстрактам и стандартному антибактериальному препарату (Внутренний контроль), является диаметр зоны задержки роста (ДЗЗР). Этот показатель представляет собой область вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиком, в пределах которой отсутствует рост микроорганизмов вследствие подавления активности антибиотиком. ДЗЗР измеряется с максимальной точностью до 1 миллиметра, принимая во внимание только участки, где наблюдается полное прекращение роста тест-культуры. При наличии неровных границ измерение проводится по наиболее четкому краю зоны подавления роста. Для повышения точности измерений целесообразно размещение чашек Петри на темной матовой поверхности, что улучшает визуализацию границы зон задержки роста и снижает погрешность субъективной оценки (**фото 7**).

Степень чувствительности микроорганизмов к каждому из испытанных антибиотиков определяют сравнением ДЗЗР с соответствующими контрольными показателями, указанными в МУК 4.2.1890-04. Для автоматизации и увеличения точности измерения зон задержки роста рекомендовано использование программного обеспечения – программа «Image Tool 3.00». Программа позволяет не только производить точные замеры зон задержки роста, но и автоматически анализировать результаты, повышая продуктивность работы лаборантов и снижая вероятность ошибок.

Определение чувствительности тест-штаммов к антибиотикам выполнено в соответствии с нормативами МУК 4.2.1890-04. Итоги оценивались по размерам ДЗЗР, сравниваемых с референсными значениями для чувствительных, промежуточных и устойчивых штаммов, представленными в **таблице 8.**

3.3. Статистическая обработка данных.

Полученные данные обрабатывались статистически с помощью пакета прикладных программ Microsoft for Windows. В таблицах указаны значения среднего арифметического ($x_{ср}$) и стандартная ошибка ($x_{ош}$) среднего ($x_{ср}\pm x_{ош}$).

Достоверность различий в опытных вариантах относительно контроля, после проверки на нормальность распределений (графическим способом) рассчитывали с использованием встроенного программного пакета Microsoft Excel for Windows (с использованием команды: формулы → Ттест; при параметрах проведения расчетов: двустороннее распределение; вид выполняемого t-теста: двухвыборочный с неравными дисперсиями). Достоверность разницы между величинами сравниваемых вариантов определялись по критерию t-критерию Стьюдента: при $p\leq 0{,}05$ и менее достоверность различий между величинами сравниваемого опытного варианта и контрольного варианта считаются достоверными.

Проведя исследование по определению антибактериальной активности экстрактов растительной биомассы можжевельников диско-диффузионным методом с контролем к антибиотику тетрациклину, нами получены данные, представленные в **таблице 9.** Как показали проведенные исследования, используемый нами в качестве модельного объекта исследования штамм кишечной палочки из коллекции кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий Института биохимических технологий, экологии и фармации Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (ИБТЭФ КФУ), является промежуточно-чувствительным к антибиотику тетрациклину в концентрации 30 мкг/диск (таблица 5, контроль-2).

По отношению к контролю-1 (растворителю, ДМСО) штамм кишечной палочки из коллекции ИБТЭФ является резистентным – при использовании стандартных дисков из фильтровального картона диаметром 6,0 мм рост кишечной палочки полностью не подавлен, и ограничивается только границей фильтровального картона, что дает возможность очень точно оценить влияние исследуемых экстрактов на рост изучаемого штамма кишечной палочки.

При исследовании антибактериальной активности экстрактов растительной биомассы можжевельников, нами установлено, что экстракты можжевельников различных видов, хоть и не проявляют высокой антибактериальной активности, но все же диаметр зон задержки роста присутствует во всех исследуемых вариантах.

По результатам наших исследований, наибольшую антибиотическую активность в отношении кишечной палочки проявили экстракты, полученные из побегов женских растений текущего года прироста можжевельника виргинского, побегов можжевельника казацкого и можжевельника колючего.

При этом нами отмечена определенная дозозависимая антибиотическая активность – наибольший диаметр зон задержки роста нами получен при использовании дозы в 3000 мкг/биомассы сырого растительного вещества на 1 диск. Далее, активность экстрактов снижается.

Поскольку по результатам нашей работы невозможно сравнить активность экстрактов различных можжевельников со стандартными антибиотиками, считаем необходимым оценить эффективность действия экстрактов (ЭДЭ, отн.ед.) различных можжевельников через показатель относительной эффективности антибактериального воздействия изучаемых экстрактов. Для этого введена формула перевода ДЗЗР, при действии экстрактов по сравнению с контролем-1 (ДМСО) в относительные единицы:

$$\text{ЭДЭ} = \left(\frac{\text{ДЗЗР экстракта} * \mathbf{100}}{\text{ДЗЗР ДМСО}}\right) - \mathbf{100}$$

где: ЭДЭ – эффективность действия экстрактов; ДЗЗР экстракта – диаметр зоны задержки роста бактерии при действии исследуемого экстракта, мм; 100 – переводной коэффициент; ДЗЗР ДМСО - диаметр зоны задержки роста бактерии при действии чистого растворителя.

Полученные при этом данные относительной эффективности изучаемых экстрактов представлены данными в **таблице 10** и данными на **графике 11.**

Как показали проведенные нами исследования, относительная эффективность экстрактов можжевельников различных видов сильно зависит от концентрации экстрактов, и вида используемого в эксперименте растения.

Наибольшая эффективность подавления нами выявлена при использовании растительного материала женских растений можжевельника виргинского. Экстракт с концентрацией исходного растительного материала 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества оказывал наибольшую эффективность подавления кишечной палочки из всех изученных экстрактов – 25,8 отн.ед. Немного менее эффективным оказались экстракты женских растений можжевельника виргинского в концентрации 300 мкг мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества и побегов можжевельника казацкого в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества (19,5 и 18,3 отн ед. соответственно).

На третьем месте по эффективности подавления кишечной палочки (около 14 отн ед. эффективности подавления) стоят три варианта исследуемых экстрактов: экстракт побегов женских растений можжевельника виргинского в концентрации 30,0 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества и побегов можжевельника казацкого в концентрации 300,0 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества, а также побегов можжевельника колючего в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества.

Все остальные варианты исследования растительного материала показали относительно низкую эффективность в подавлении штамма кишечной палочки (менее 10 отн ед.).

ВЫВОДЫ

Проведены исследования по изучению антибактериальной активности трех видов можжевельников произрастающих в ботаническом саду Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (г. Симферополь).

Осуществлено приготовление растительных экстрактов можжевельников трех видов с таким расчетом, чтобы получить содержание конечного экстракта от 3000 до 3 мкг растительной биомассы на 1 диск.

Проведена оценка антибиотикочувствительности (этапы): приготовление питательной среды, приготовление инокулюма, инокуляция, инкубация и аппликация, учет и интерпретация полученных результатов.

Установлено, что наибольшая эффективность подавления музейного штамма кишечной палочки (25,8 отн.ед.) выявлена при использовании экстракта из растительного материала побегов текущего года прироста собранных с женских растений можжевельника виргинского с концентрацией исходного растительного материала 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества.

Экстракт из побегов женских растений можжевельника виргинского в концентрации 300 мкг мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества и побегов можжевельника казацкого текущего года прироста в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества оказали промежуточное эффективное действие в отношении подавления исследуемого штамма кишечной палочки (19,5 и 18,3 отн ед. соответственно).

Экстракт побегов женских растений можжевельника виргинского в концентрации 30,0 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества, экстракт побегов можжевельника казацкого в концентрации 300,0 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества, а также экстракт побегов можжевельника колючего в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества подавляют рост кишечной палочки с относительной эффективностью около 14 отн. ед.

Успешно выполнены требования по стерильности и методике микробиологического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проанализирована антибактериальная активность экстрактов трех видов можжевельников разной концентрации в отношении коллекционного штамма E. coli.
2. Определено, что относительная эффективность экстрактов можжевельников различных видов сильно зависит от концентрации экстрактов, и вида используемого в эксперименте растения.
3. Выявлена наибольшая эффективность подавления штамма кишечной палочки при использовании экстракта из материала женских растений можжевельника виргинского в концентрации 3000 мкг/диск биомассы сыр. растительного вещества.
4. Доказана перспективность исследований чувствительности бактерий к экстрактам можжевельников различных видов для решения вопросов антибиотикорезистентности.
5. Полученные данные указывают на возможность разработки антибиотических препаратов на основе экстрактов можжевельника.

Предложения по дальнейшему развитию темы научного исследования:

1. исследовать антибактелиальное действие экстрактов можжевельников по отношению к другим возбудителям;
2. проанализировать антимикотическое действие можжевельников;
3. выявить противовоспалительное действие можжевельников;
4. сравнить антибактериальное и антимикотическое действие экстрактов можжевельников;
5. изучить особенности создания эффективного фитонцидного барьера при помощи озеленения городской среды можжевельником.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубашинская, Н. В. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация (часть II) / Н. В. Дубашинская, О. М. Хишова, О. М. Шимко // Вестник фармации. – 2007. – № 2(36). – С. 70-79.
2. Егоров, Н.С. Руководствок практическим занятиям по микробиологии: учеб.-метод. пособие / Н. С. Егоров. – 3-е изд., перераб. и доп. Москва : Изд-во МГУ, 1995. – 320 с.
3. Иванченко О. Б., Онуфриенко Г. С. Изучение антимикробной активности экстрактов можжевельника и их влияние на микробную контаминацию хлебобулочных изделий// Вестник КрасГАУ. 2024. №. 5. С. 230-239.
4. Кайзер А.А., Корниенко И.П. Биохимический состав шишкоягод и побегов можжевельника обыкновенного (JuniperusCommunis L.), произрастающего на Таймыре // Культура. Наука. Производство. 2021. № 7. С. 24–28.
5. Князева, С.Г. Изменчивость морфологических признаков сибирских видов можжевельника // Лесоведение. - 2007. - № 1. - С. 65-69.
6. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований : учеб. пособие / А. С. Лабинская ; под общ. ред. проф. А. С. Лабинской. — 3-е изд., испр. и доп. — Москва : Медицина, 1978. — 480 с.
7. Методические указания. МУК 4.2.1890–04: Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Минздрав России, 2004. – 48 с.
8. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», 2005., – 415 с.
9. Определитель высших растений Крыма. Коллектив авторов. Под общей редакцией Н.И. Рубцова. 1972. Изд-во «Наука», Ленингр. отд., Л. 1-550.
10. Покровский В.И. Энтеробактерии. Руководство для врачей / В.И. Покровский. – Москва: Медицина, 1985 – 320 с.
11. Токин Б.П. Биологическая роль фитонцидов / Фитонциды. Томск. 1944. С. 224 – 280.
12. Токин Б.П. Целебные яды растений. Повесть о фитонцидах. Изд. 3-е, испр. и доп.— 5 Изд-во Ленингр. университета, 1980.—280 с.
13. Турова Л.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. М.: Медицина, 1982. 304 с.
14. Фирсов, Н.Н. Микробиология : [слов. терминов] / Фирсов Н. Н. - Москва : Дрофа, 2005. 255 с.
15. Шутова А.Г., Спиридович И.М. Состав эфирных масел представителей рода Juniperus L., интродуцированных в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / А.Г. Шутова, Е. В. Спиридович, И. М. Гаранович [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4, № 1. – С. 115-130. – EDN KCVSHK.
16. Adams, R.P. 2008. The junipers of the world: The genus Juniperus, 2nd Edition. Trafford Publ., Victoria, BC.

Приложение 1. Охрана труда

Входить, находится, работать в лаборатории строго в халате и сменной обуви, для защиты одежды и тела от реактивов, микроорганизмов. В спецодежде запрещается выходить за пределы лаборатории, а также есть, пить и курить. Вовремя проведение экспериментальных опытов необходимо использовать, только чистую и сухую посуду. Для отмеривания реактивов необходимо использовать мерную посуду (пипетки, мензурку, бюретки, мерный стакан или цилиндр); избыток налитого в пробирку реактива не следует выливать обратно в емкость, чтобы не испортить основной реактив.

В ходе эксперимента с нагреванием, необходимо использовать термоустойчивую посуду с отметкой матовый прямоугольник или круг, ход работы должен соответствовать предусмотренным указанием на электроплите, водяной бане или газовой горелке, спиртовки. Нужно помнить, что летучие вещества нагревать над открытым пламенем опасно! Перед работой с горелкой следует убедиться, что фитиль выпущен на нужную высоту и развернут, а черенок сухой, при зажигании горелки нужно убедиться в ее исправности. Следует помнить, что переносить зажженную горелку, спиртовку – небезопасно! Запрещено зажигать одну спиртовку над другой. При работе со спиртовкой необходимо использовать только специальные смеси для нее, либо этанол, другие смеси использовать небезопасно. После окончания работы задувать пламя спиртовки категорически запрещено! Следует накрыть фитиль колпачком, который должен находится всегда под рукой. Всю работу в лаборатории нужно выполнять аккуратно, внимательно, добросовестно и рационально распределять время.

Во время проведения бактериологических исследований запрещается:

- проводить работу с материалом без резиновых перчаток и стерильных инструментов (пинцетов, игл, петлей, корнцангов);
- руками прикасаться к исследуемому материалу;
- следует не допускать соприкосновений рук с конденсатом водяного пара в засеянных чашках;
- посуду с посевами патогенных или неизвестных микроорганизмов размещать непосредственно на столах;
- инфицированные жидкости переливать из сосуда в сосуд через край;
- по окончании работы оставлять на столах мазки (не зафиксированные), пробирки и чашки Петри, другую посуду с микробным материалом;
- по окончании работы с культурой необходимо протереть дезинфицирующим раствором поверхность рабочего стола.
- по окончании работы необходимо путем фламбирования простерилизовать инструменты (микробиологические петли, иглы, пинцеты, скальпели и тд.).

Во время проведений бактериологических исследованиях следует:

- в работе использовать только посуду без повреждений и по назначению;
- посев бактериологического материала проводить около огня с обжиганием петель, шпателей, краев пробирок; иглы, петли и микологические крючки прокаливать в пламени;
- открывать пробирки, чашки Петри и другую посуду с культурой, только в близи огня с целью предотвращения контаминации культуры;
- при посеве материала делать надписи на культуральных сосудах с указанием материала, культуры и даты посева или регистрационного номера по журналу;

- все чашки с посевами помещать в кюветы или на подносы, пробирки – в штативы и так же на подносы или в кюветы;
- после исследования культуру нужно обеззаразить (автоклавировать при 1 атм. в течение 20-30 мин), после этого вычистить и помыть в перчатках.

В ходе проведения опытов нужно помнить о правилах работы с химическими реактивами:
- при работе с реактивами необходимо использовать пинцет или ложечку, шпатель;
- при изучении запаха вещества, следует аккуратно движением ладони направлять поток воздуха в свою сторону;
- при взвешивании щелочи стоит быть аккуратным, чтобы пыль не попала в дыхательные пути;
- с концентрированными растворами щелочи, кислоты следует работать в перчатках;
- следует беречь кожные покровы от попадания на них химических веществ;
- запрещается сливать реактивы в канализацию;

Во время пожара, прежде всего необходимо выключить подачу электроэнергии ко всем электроприборам, желательно обесточить все помещение. В случае возгорания органических веществ следует использовать огнетушитель, песок либо пожарное одеяло.

В ходе выполнения работы полученные незначительные ожоги (веществами, горячими предметами или паром) травмированное место обрабатывают спиртом или раствором перманганата калия, ежели ожоги тяжелые немедленно обратиться к врачу.

Приложение 2.

Таблица 1. Список растительного материала можжевельников из ботанического сада КФУ

№ п/п	Латинское название	Русское название	Тип исследуемого материла
1	*Juniperusvirginiana*L. GreyOwl	Можжевельник виргинский	Побеги мужских растений текущего года прироста
2			Побеги женских растений текущего года прироста
3	*Juniperus sabina*L.	Можжевельник казацкий	Побеги растений текущего года прироста
4	*Juniperus oxycedrus*L.	Можжевельник колючий	Побеги растений текущего года прироста
5	*Juniperusvirginiana* Grey Owl	Можжевельник виргинский	Шишкоягоды с женских растений текущего года прироста

Приложение 3.

Таблица 2. Последовательность разведений экстрактов растительного материала для определения антибиотической активности можжевельников из ботанического сада КФУ

№	Характеристика	Навеска	Расчетное количество

экстракта п/п		растительного материала / кол-во ДМСО	растительного материала из расчета на 1 диск
1	Исходный экстракт можжевельников (для каждого вида – отдельный эфктсракт)	3,0 г / 12,8 г	3000,0 мкг / диск
2	Разведение исходного экстракта (№1) в соотношении 1:10 чистым растворителем	9,0 мл ДМСО+ 1 мл экстракта №1	300,0 мкг/диск
3	Разведение экстракта №2 в соотношении 1:10 чистым растворителем	9,0 мл ДМСО+ 1 мл экстракта №1	30,0 мкг / диск
4	Разведение экстракта №3 в соотношении 1:10 чистым растворителем	9,0 мл ДМСО+ 1 мл экстракта №1	3,0 мкг / диск

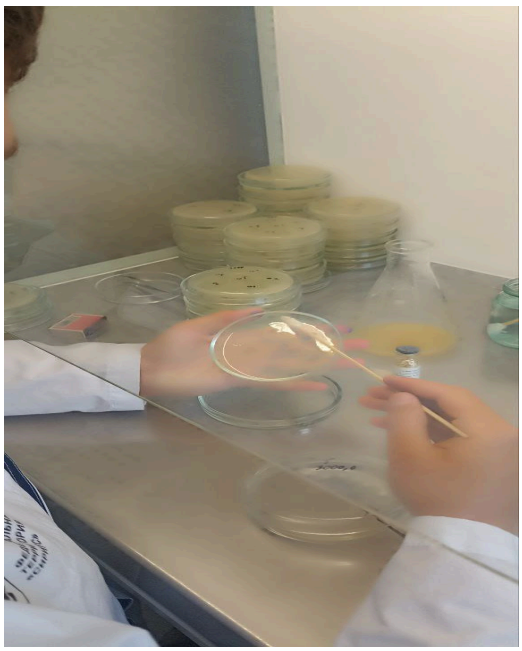
Приложение 4.Фото 3. Приготовление питательной среды.



Приложение 5.Фото 4. Приготовление инокулюма.



Приложение 6.Фото 5. Инокуляция.

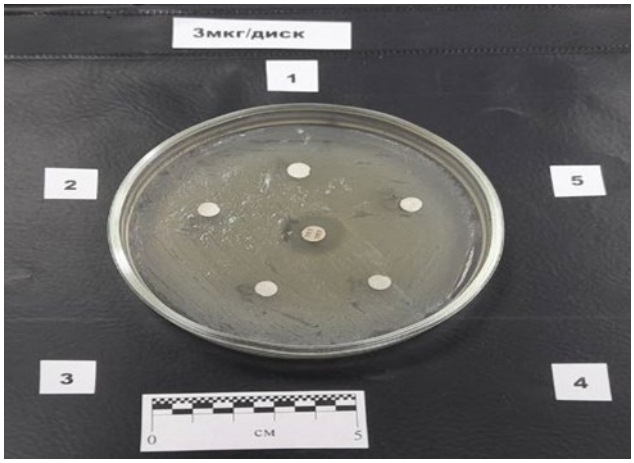


Приложение 7.Фото 6. Аппликация дисков и инкубация.



Приложение 8.Фото 7.Определение чувствительности *E. coli*к экстрактам можжевельников в концентрации 3,0 мкг растительной массы/диск диско-диффузионным методом, и стандартному антибиотику тетрациклину:

1 –можжевельник виргинский, побеги мужских растений текущего года прироста; 2 –можжевельник виргинский, побеги женских растений текущего года прироста; 3 –можжевельник казацкий побеги растений текущего года прироста; 4 –можжевельник колючий, побеги растений текущего года прироста; 5 –можжевельник виргинский незрелые шишкоягоды с женских растений текущего года прироста; тет – тетрациклин (внутренний контроль чувствительности, производство НИЦФ) [фото автора].



Приложение 9.Таблица 8. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности Enterobacteriaceae: пограничные значения ДЗЗР (мм) [МУК 4.2. 1890-04]

Антибактериальные препараты	Химико-фармакологическая группа антибиотика, Содержание в диске (мкг)	ДЗЗР, мм		
		R	I	S
Тетрациклин	Тетрациклины, 30мкг/диск	≤14	15-18	≥19

Приложение 10.Таблица 9. Результаты определения чувствительности кишечной палочки из коллекции ИБТЭФ к экстрактам можжевельников, растворителю и стандартному антибиотику

Вариант опыта	Концентрация исследуемого экстракта, мкг массы сыр. растительного вещества на 1 диск							
	3000 мкг/диск		300 мкг/диск		30 мкг/диск		3,0 мкг/диск	
	Диаметр зоны подавления роста *E. coli*, мм*/ характеристика чувствительности**							
ДМСО (контроль - 1)	6,00 ± 0,01****				R			
М-1***	6,50 ± 0,12****	R	6,28 ± 0,11****	R	6,10 ± 0,079****	R	6,10 ± 0,026****	R
М-2***	**7,55 ± 0,13****	R	**7,17 ± 0,12****	R	**6,81 ± 0,114****	R	6,47 ± 0,109****	R
М-3***	**7,17 ± 0,12****	R	**6,81 ± 0,11****	R	6,47 ± 0,109****	R	6,15 ± 0,103****	R
М-4***	6,81 ± 0,11****	R	6,47 ± 0,11****	R	6,15 ± 0,103****	R	6,05 ± 0,018****	R
М-5***	6,47 ± 0,11****	R	6,15 ± 0,03****	R	6,05 ± 0,025****	R	6,00 ± 0,020****	R
Тетрациклин, 30 мкг/диск (контроль-2)	16,36 ± 0,29				I			

Примечания к таблице 5.

* – в таблице указаны среднее ± стандартная ошибка среднего ДЗЗР, мм;

** – согласно МУК 4.2. 1890-04: R – резистентный, устойчивый; I – промежуточно-устойчивый (см. табл. 2.3);

*** – М-1 – можжевельник виргинский, побеги мужских растений текущего года прироста; М-2 – можжевельник виргинский, побеги женских растений текущего года прироста; М-3 – можжевельник казацкий побеги растений текущего года прироста; М-4 – можжевельник колючий, побеги растений текущего года прироста; М-5 – можжевельник виргинский незрелые шишкоягоды с женских растений текущего года прироста;

**** – данные достоверно отличаются при сравнении с контролем-2 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

Приложение 11.Таблица 10. Относительная эффективность действия экстрактов можжевельников различных видов в отношении кишечной палочки

№ п/п	Вариант растений	Концентрация исследуемого экстракта, мкг массы сыр. растительного вещества на 1 диск			
		3000	300	30,0	3,0
		Эффективность действия экстрактов, отн. ед.			
1	М. виргинский, побеги мужских растений	8,3	4,7	1,7	1,7
2	М. виргинский, побеги женских растений	25,8	19,5	13,5	7,8
3	М. казацкий побеги растений	18,3	13,5	7,8	2,5
4	М. колючий, побеги растений	13,5	7,8	2,5	0,8
5	М. виргинский незрелые шишкоягоды с женских растений	7,8	2,5	0,8	0,0

Приложение 12.

График 11. Относительная эффективность действия экстрактов можжевельников различных видов в отношении подавления роста кишечной палочки при диско-дифузионном методе исследования.

