

Міністерство освіти і науки України
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Т.В. СКЛЯР, Н.В. КУРАГІНА

АНТИМІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт і організації
самостійної роботи студентів

Дніпро 2024

УДК: 57.01/579.2

Рекомендовано до друку кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології біолого-екологічного факультету ДНУ ім. О.Гончара, протокол № 13 від 04.03.2024	Ухвалено вченою радою біолого-екологічного факультету ДНУ ім. О. Гончара, протокол №9 від 18.03.2024р
---	---

Автори:

Скляр Тетяна Володимирівна – к.б.н., доцент, завідувачка кафедри мікробіології вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Курагіна Ніна Володимирівна – к.б.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Рецензенти:

Шарамок Тетяна Сергіївна – к.с.-г.н., доцент, завідувачка кафедри загальної біології та водних біоресурсів Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Хоменко Олена Миколаївна – к.б.н., доцент кафедри біохімії та фізіології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Скляр Т.В., Курагіна Н.В. Антимікробні препарати. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт і організації самостійної роботи студентів/ Скляр Т.В., Курагіна Н.В. – Дніпро, Вид-во Дніпровського національного університету, 2024, 34с.

Вданій роботі наведено рекомендації щодо виконання лабораторних робіт та організації самостійної роботи студентів, метою яких є опанування студентами сучасних знань з технології отримання антимікробних препаратів.

Методичні рекомендації мають науково-практичне значення і можуть бути використані викладачами та студентами на практичних лабораторних заняттях. i

Для підготовки магістрів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

©Скляр Т.В., Курагіна Н.В. Антимікробні препарати. 2024

©Вид-во ДНУ ім. О. Гончара, 2024

Зміст

Лабораторна робота № 1. Виділення мікроорганізмів-антагоністів із природних умов їх існування різними методами.

Лабораторна робота №2. Ідентифікація актиноміцетів.

Лабораторна робота №3. Паперова хроматографія антибіотиків.

Лабораторна робота №4. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків.

Лабораторна робота № 5. Визначення антагоністичної активності пробіотичних штамів бацил по відношенню до тест-культур мікроорганізмів.

Методичні рекомендації до виконання самостійної роботи

Список рекомендованої літератури

ВИДІЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-АНТАГОНІСТІВ ІЗ ПРИРОДНИХ УМОВ ЇХ ІСНУВАННЯ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ

Мета: Виділити антагоністичні форми актиноміцетів із різних ґрунтових зразків і визначити їх антимікробний спектр.

Прилади і матеріали: мікроскоп МБІ-1, предметні скельця, імерсійна олія, бактеріологічна петля, стерильні пробірки та піпетки, стерильні чашки Петрі, колби на 200-500мл, чашки і пробірки з МПА, зразки ґрунту. Культури мікроорганізмів: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *B. cereus* – як тест-об'єкти. Кружечки фільтрувального паперу, діаметром 9 мм; смужки з паперу, довжиною 30 мм, шириною 5 мм; розчини антибіотиків з відомим титром; живильне середовище такого складу: сахароза чиста—10г, сухий кукурудзяний екстракт ~5г; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ — 2г; KH_2PO_4 — 2г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25г, CaCO_3 — 1 г, агар — 20г, вода дистильована — 1000 мл, рН після стерилізації протягом 30 хв при 120° С – 6,35.

Теоретичні відомості

Мікроорганізми в природних умовах існування ніколи не бувають ізольованими, а найчастіше об'єднані у певні асоціації, де між окремими видами складаються різні взаємозв'язки: метабіоз, симбіоз, антагонізм і паразитизм.

Метабіоз - такий взаємозв'язок організмів, коли продукти життєдіяльності одного організму використовуються іншим.

Симбіоз – взаємодія двох або більше організмів, які знаходять від спільного існування взаємовигідні умови.

Антагонізм – взаємозв'язки, при яких один організм пригнічує розвиток інших.

Паразитизм – явище, коли один організм живе цілком за рахунок іншого, спричиняючи в деяких випадках загибель свого хазяїна.

Антагоністичні властивості мікробів проявляються різними шляхами: утворенням антибіотико-специфічних продуктів обміну мікроорганізмів.

Мікроорганізми, у яких в еволюційному ході їх розвитку з'явилася і спадково закріпилася здатність утворювати антибіотичні речовини, перебувають у більш вигідному положенні в умовах гострої боротьби за існування. Найбільша кількість антагоністів спостерігається в місцях, де наявні різні види мікроорганізмів і, отже, найбільш гостро розвивається конкурентна боротьба. Наприклад, в удобрених ґрунтах, перегної і т.д. Утворення антибіотичних речовин залежить також і від екологічних умов, які визначають характер обміну речовин антагоністів.

На обмін речовин, як відомо, впливають характер і властивості живильних і енергетичних речовин, аерація, температура, фізико-хімічні умови середовища та ін. Утворення антибіотичних речовин часто пов'язане з певною стадією розвитку організму.

Методи виділення з природних субстратів бактерій і актиноміцетів-антагоністів ідентичні. Однак у процесі відокремлення представників тієї або іншої групи мікроорганізмів необхідно враховувати їх специфіку, і тому створювати умови, сприятливі для переважного розвитку бажаної групи організмів.

При виділенні актиноміцетів із природних субстратів необхідно враховувати умови, які позитивно впливають на розвиток цих організмів і не перешкоджають розвиткові бактерій та грибів. До таких належать склад живильного середовища й насамперед характер джерел азоту та вуглецю, кислотність середовища й температура.

Для виділення актиноміцетів можна використовувати синтетичні середовища, джерелом вуглецю в яких служить крохмаль, а джерелом азоту – амонійні або нітратні солі. Поширені такі середовища:

<u>Середовище 1</u>		<u>Середовище 2(Гаузе)</u>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1г	K ₂ HPO ₄	0,5г
K ₂ HPO ₄	1г	MgSO ₄	0,5г
NaCl	1г	NaCl	0,5г
MgSO ₄	1г	KNO ₃	1,0г
Крохмаль	10г	FeSO ₄	0,01г
Вода водопровідна	1000мл	Крейда	0,5г
Агар-агар	15г	Крохмаль	20 г
Крохмаль	10м	Агар-агар	20г

Середовища стерилізують при 120⁰ С протягом 30 хв, рН середовищ 6,8-7,1.

Хід роботи

1. Виділення антагоністично активних форм актиноміцетів

Добір ґрунтових зразків. Для виділення актиноміцетів-антагоністів треба відібрати по 2 – 3 зразки ґрунтів різного ступеня удобреності, зняти поверхневий шар ґрунту. Добір робити з глибини 5 – 10 см. На паперовому пакеті, куди уміщують ґрунт, слід зазначити дату збору, назву місця, тип ґрунту, рослинність.

а) Виділення актиноміцетів методом висіву ґрунтової бовтанки: пробу ґрунту вагою 1 г помістити в колбу на 200мл, наповнена 100 мл стерильної водопровідної води. Вміст треба струшувати протягом 5 хв, після чого з отриманої суспензії

зробити ряд послідовних розведень, доводячи розведення вихідного матеріалу до 1:1000 000.

Для виготовлення послідовних розведень необхідно взяти 4 пробірки з 9 мл стерильної водопровідної води в кожній. Піпеткою набрати 1 мл суспензії з вихідної колби, де вміст мікрофлори ґрунту розведений у 100 разів (1 г ґрунту на 100 мл води), і внести в першу пробірку. Вміст пробірки ретельно перемішати. При цьому одержимо розведення 1:1000. Потім із першої пробірки слід взяти 1 мл суспензії і внести в другу, яку також ретельно перемішати. У другій пробірці отримаємо розведення 1:10000 і т.д.

Після того, як буде зроблене останнє розведення, необхідно взяти піпеткою 1 краплю суспензії, (розведення 1:1000000) і нанести на агаризоване живильне середовище в чашці Петрі, розподілити рівномірно стерильним шпателем по всій поверхні чашки. Щоб уникнути повторних посівів, краще робити висів із усіх 4-х розведень. Підрахунок колоній актиноміцетів рекомендується робити на чашках із середньою щільністю росту (200-250 колоній на чашці). З кожного зразка субстрату необхідно зробити висів принаймні в 3 чашки.

Засіяні чашки інкубують в термостаті при температурі 28 – 30 °С протягом 5–10 діб. За цей час на поверхні живильного субстрату встигають вирости бактерії й актиноміцети, а також інша мікрофлора. Чашки переглядають і виділяють колонії актиноміцетів із загальної маси колоній.

Характерні ознаками колоній актиноміцетів такі: колонії мають пухнастий, бархатистий, або борошнистий наліт, що складається з ниток повітряного міцелію. Він може бути білого, димчастого, сірого, зеленуватого, рожевого, блакитного, кремового або інших відтінків цих кольорів. Колонії актиноміцетів бувають схожі на колонії цвілевих грибів. Часто колонії, що виростили на м'ясо-пептонному агарі, суловому агарі та деяких інших складних середовищах, позбавлені повітряного міцелію. Колонії актиноміцетів можна відрізнити за консистенцією. Актиноміцетні колонії шкірясті, щільні, врастають міцелієм у субстрат, петлею не захоплюються. Бактеріальні колонії, як правило, мають тістоподібну або пастоподібну консистенцію і легко захоплюються петлею.

Мікроскопування колоній актиноміцетів здійснюють так: відкриту чашку Петрі уміщують на столик мікроскопа й при малому збільшенні (об'єктив x10 і окуляр x15 або x10) переглядають край колонії. На краю колонії актиноміцетів при такому збільшенні добре видно тонкі нитки повітряного або субстратного міцелію. Після того як колонії актиноміцетів встановлені, їх необхідно пронумерувати й вивчити антагоністичні властивості кожного актиноміцетного штаму.

Антагоністичні властивості актиноміцетів можна вивчити за двома методами: 1) методом поверхневого заливу виростилих колоній; 2) методом ізольованого відсіву кожної колонії з подальшим іспитом їх на антагонізм.

Сутність першого методу полягає в тому, що колонії актиноміцетів, що вирости в чашках, заливають тонким шаром м'ясопептонного агару з домішкою тест-організму. Для цього в колбу або пробірку з розплавленим і охолодженим до 50⁰С МПА вносять певну кількість тест-організму, агар ретельно перемішують і розливають навколо виростих колоній. Після цього чашки ставлять на 10 – 12 год. при низькій температурі (10 – 15 ⁰С) для того, щоб антибактеріальна речовина встигла продифундувати в агар перед тим, як розростеться тест-організм. Потім інкубують чашки при температурі 37⁰С. Через 24 год. за наявності зон відсутності росту тест-організму навколо колоній актиноміцетів визначають їх антагоністичні властивості. Після цього колонії, які мають антагоністичні властивості, повинні бути відсіяні. Відсів роблять на поверхню агаризованих середовищ у чашки Петрі, а потім з окремих колоній ізолюють чисту культуру.

Суть другого методу полягає в тому, що колонії, які вирости на чашках, пересівають у пробірки зі скошеним агаром спочатку на щільне середовище, на якому організм виділявся в чашці Петрі. Після того як актиноміцети добре розвинулися (3-5діб), їх пересівають на ряд середовищ, які містять різні джерела азоту й вуглецю.

Багато організмів виділяють антибіотики в навколишнє середовище в різні періоди їх розвитку, тому необхідно перевіряти антагоністичні властивості у актиноміцетів на 3–5 і 8–10, а також на 15–20 добу росту.

Перевірка виростих культур на їх антибіотичну активність здійснюється за такими методами:

а) методом накладення грудочок. Для цього петлею або стерильним пінцетом вирізають шматочок агару з актиноміцетом, який виріс на ньому, і вміщують на поверхню МПА, попередньо засіяного тест-організмом. Чашки ставлять на 18–20 год у термостат при температурі 37⁰С. За наявності зон відсутності росту тест-організму визначають антагоністичні властивості досліджуваного організму;

б) метод скупченого висіву: ґрунт у невеликих розведеннях (1:10 до 1:100) висівають на м'ясопептонний агар або інше середовище в чашки Петрі для того, щоб створити більш щільний ріст мікрофлори на агаризованому середовищі. Антагоністи проявляються тим, що навколо їх колоній утворюються зони відсутності росту сусідніх організмів. Чашки інкубують при температурі 28–30⁰С протягом 7 діб;

в) метод безпосереднього висіву ґрунту на виростий газон: поверхню живильного агару в чашці Петрі засівають бактеріями або грибами, для яких необхідно знайти антагоніста. Засіяні чашки витримуються у термостаті при 28–37⁰С 24–48 год. Потім на поверхню газону, що виріс уміщують невеликі шматочки ґрунту або ґрунтовий пил. Чашки Петрі знову ставлять в термостат при

28⁰С. Через кілька днів навколо вирослих колоній антагоністів утворяться зони лізису. Антагоніст виділяється в чисту культуру і його вивчають далі;

г) метод збагачення ґрунту: ґрунт, із якого передбачається виділити антагоністів, збагачують тими видами мікроорганізмів, щодо яких треба виділити антагоністів. Для цього свіжі зразки ґрунту уміщають у скляні посудини або квіткові горщики і створюють оптимальну вологість ґрунту для аеробних мікробів (близько 60% вологості). Посудини накривають скляними пластинками й уміщають у термостат при 28⁰С або 37⁰С.

До зразків ґрунту систематично додають відмиті суспензії живих мікроорганізмів, уникаючи надмірного зволоження і створення анаеробних умов. Через певний час досліджувані зразки ґрунту перевіряють на наявність у них антагоністів, активних щодо організмів, які додаються в ґрунт. Це досягається шляхом висіву збагаченого ґрунту в чашку Петрі, де «газоном» є мікроби, занесені в ґрунт;

д) метод бактеріальних агарових пластинок: готують водний розчин 1,5–2 % агар-агару, попередньо промитого дистильованою водою. До розчину агару додають 1% глюкози й 0,2% K₂HPO₄. Агарове середовище розливають у пробірки по 10 мл і стерилізують. Стерильний агар розплавляють і вміщують у водяну баню при температурі 42⁰С. Після цього до рідкого агару, охолодженого до 42⁰С, додають промиту відцентрифуговану суспензію живих бактерій певного виду і ретельно з ним перемішують. Занесені в агар бактерії слугують джерелом азоту. Бактеріальний агар виливають у ряд чашок Петрі, кожна з яких містить по 1 мл розведень свіжого або збагаченого ґрунту, попередньо розведеного стерильною водою від 1:100 до 1:10000. Вміст чашок ретельно перемішують, щоб рівномірно розподілити ґрунтову суспензію в бактеріальному агарі. Після цього чашки інкубують у термостаті при температурі 28⁰ С або 37⁰ С. Через 3–10 діб залежно від природи досліджуваних організмів, можна виявити антагоністів за світлими зонами, що оточують колонії. Із цих колоній виділяють культури, які потім досліджують щодо відношенні до антагоністичних властивостей.

2. Визначення антимікробного спектра чистих культур актиноміцетів-антагоністів

Для визначення антибіотичних властивостей актиноміцета застосовують методи, засновані на здатності антибіотика дифундувати в товщу агару й затримувати ріст або вбивати мікроорганізми, які знаходяться в зоні дифузії антибіотика.

Антимікробний спектр виділених чистих культур актиноміцетів-антагоністів вивчають за методом перпендикулярних штрихів і методом агарового блочка.

Метод перпендикулярних штрихів

Кожну досліджувану культуру актиноміцетів висівають на модифіковане середовище Чапека в чашки Петрі штрихом, який розділяє чашку по максимальному діаметру. Після того як актиноміцети добре виростуть і утворюють антибіотичну речовину (звичайно через 4–7 діб інкубації посівів при температурі 28°C), перпендикулярно до їх нальоту, необхідно зробити штрихові посіви різних тест-мікроорганізмів. Як тест-об'єкти досліджують такі мікроорганізми: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*.

Зуказаних культур готують суспензії, які містять 500 млн мікробних клітин у 1 мл, які використовують для визначення антибіотичного спектра виділених актиноміцетів. Суспензії 4 тест-культур підсівають з одного боку штриха актиноміцета, який виріс, з іншого. Чашки ставлять у термостат при температурі 37°C.

У ході обчислення результатів визначають спектр антагоністичної дії кожної культури актиноміцета, що вивчається. Тест-об'єкти, нечутливі до антибіотичної речовини, яка виділяється, ростуть біля краю штриха актиноміцета. Чутливі мікроорганізми розвиваються на більшій чи меншій відстані від штриха досліджуваної культури. Для оцінки рівня чутливості кожного тест-об'єкта необхідно виміряти в міліметрах величину зони пригнічення його росту. Дані про спектр і рівень антибіотичної дії виділених актиноміцетів, заносять до табл. 1.

Таблиця 1
Антагоністичний спектр дії виділених актиноміцетів

№ досліджуваних культур	Зона пригнічення росту тест-об'єкта, мм						
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. cereus</i>
1	0	0	20	0	18	19	20
2	18	12	22	18	20	22	24
3	10	8	18	0	24	20	22
4	0	0	16	20	20	20	18

Метод агарових блочків

Кожну досліджувану культуру актиноміцетів висівають на модифіковане середовище Чапека в чашки Петрі й розподіляють по всій поверхні шпателем. Після того як актиноміцет добре розвинувся й укрит середовище суцільним газоном, пробковим свердлом, зануреним спочатку в спирт, а потім в полум'я горілки, вирізають агарові блочки.

Кожен блочок кладуть у центр пустої стерильної чашки Петрі міцелієм актиноміцета вгору. Після цього в чашки Петрі навколо блочків наливають по 20 мл розплавленого й охолодженого до 40 °С МПА. Коли агар застигне, чашки на 3–4 год ставлять у термостат при температурі 26–28 °С для дифузії антибіотика з блочків у навколишнє середовище. Потім чашки виймають із термостата й на поверхню агарової пластинки радіусами від периферії чашки до блочка петлею проводять посів, при цьому використовують суспензії тест-організмів. Чашки ставлять на 24 год у термостат при 28–30 °С. Чутливість тест-організмів до антибіотика, що вивчається, визначають, вимірюючи відстань від блочка з актиноміцетом до початку росту тест-організму. Результати записують у табл. 2.

Таблиця 2

Антимікробний спектр дії виділених актиноміцетів

Тест-організми	Зони пригнічення росту тест-організмів, мм			
	1	2	3	4
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Actinomyces griseus</i>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
<i>Aspergillus niger</i>				

3. Біосинтез антибіотичних речовин у виділених актиноміцетах

Біосинтез антибіотичних речовин досліджується кожним студентом у одній виділеній із ґрунту культурі актиноміцета. В групі вивчається біосинтез у різних актиноміцетів, які відрізняються за спектром антимікробної дії, та морфологічними і культуральними властивостями.

Із метою визначення утворення антибіотиків треба зробити посів 7–10 добової культури актиноміцета на рідкі середовища. Засівають шматочками середовища з вирощеною культурою актиноміцета, які вирізають і переносять стерильно.

Поверхневекультивування.

Досліджувану культуру актиноміцета засівають у рідке середовище Чапека, розлите в колби по 100–150 мл. Колби ставлять до термостата на 7–10 діб. Ураховується час появи плівки, її характер. З метою виявлення й визначення його концентрації відбирають культуральну рідину через 5,7 і 10 діб.

Глибинне культивування.

Для виявлення біосинтезу антибіотиків актиноміцетами в умовах пригніченого росту використовують різні синтетичні й органічні середовища. Досліджувані культури актиноміцетів засівають у пробірки, які містять по 7 мл середовища такого складу:

Соєве борошно	1%	Крохмаль	1%
Глюкоза	1%	Кукурудзяний екстракт (рідкий)	2%
NaCl	0,5%	Соєве борошно	1%
CaCO ₃	0,1%	NaCl	0,5%
		K ₂ HPO ₄	0,2%
		CaCO ₃	0,2%

Пробірки із засіяним поживним середовищем ставлять на качалку, яка робить 220–240 об/хв. При цьому середовище в пробірках постійно струшується і перемішується, тим самим добре аерується. Вирощувати актиноміцет треба при температурі 28 °С протягом 4–7 діб. Для виявлення антибіотика відбирають по 2 мл культуральної рідини з кожної пробірки через 4-5 і 7 діб глибинного культивування. Для отримання культуральної рідини без міцелію використовують піпетки з уміщеною на одному кінці стерильною ватою, через яку відбувається відфільтрування рідини у процесі відбору проб.

Визначення антибіотичної активності культуральної рідини

Для цього застосовують, один із найбільш простих і поширених методів – метод серійних розведень. Принцип його полягає в тому, що досліджувані культуральні рідини з невідомою концентрацією розводять послідовно в ряді пробірок з поживним середовищем, у які засівають тест-мікроб. Після добової інкубації посівів при температурі 37°С визначають наявність антибіотика в досліджуваних рідинах за затримкою росту тест-культури, його концентрація виражається титром. Антибіотичний титр – це те найбільше розведення досліджуваної рідини, при якому пригнічується ріст тест-культури.

Кожен студент визначає антибіотичну активність 3 культуральних рідин актиноміцета, який виріс за допомогою застосування поверхневого й глибинного методів. Спочатку необхідно приготувати початкове розведення досліджуваних рідин (1:5). З цією метою 1 мл культуральної рідини, яка не містить міцелію,

вносять у пробірки з 4 мл стерильної води. Щоб отримати ряд послідовних розведень 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д., треба стерильно розливати в пробірки по 1 мл розтопленого МПА. Крім того, в інші пробірки розливають по 2 мл стерильної дистильованої води. Пробірки з розтопленим агаром ставлять у водяну баню при температурі 50°C. Потім, використовуючи кінцеві піпетки на 5 мл, відбирають 3 мл початкового розведення досліджуваної рідини. 1 мл початкового розведення (1:5) вносять у пробірку з розплавленим агаром, агар з рідиною перемішують (при цьому розведення досліджуваної рідини збільшується у 2 рази, тобто в агарі виходить розведення 1:10), пробірку кладуть у похиле положення, щоб отримати “косячок”. 2 мл рідини, які залишилися (розведення 1:5), переносять у пробірку з 2 мл води (отримуємо розведення 1:10), із цієї пробірки знову відбирають 3 мл – 1 мл змішують з 1 мл агару (розведення 1:20), 2 мл – з 2 мл води (розведення 1:40) і т.д. На пробірках із застиглими косячками позначають номер культуральної рідини й порядкові номери, які відповідають розведенням 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. На застигнуті косячки роблять штриховий посів суспензії тест-культури. Як тест-культуру використовують стафілокок, із добової культури якого необхідно приготувати суспензію густиною 500 млн кл/мл. Пробірки ставлять у термостат при температурі 37°C. Облік результатів здійснюють через 24 год. У разі відсутності росту тест-мікроба визначається антибіотичний титр досліджуваної рідини. Наприклад, стафілокок починає рости в 1-й пробірці (розведення 1:160), антибіотичний титр культуральної рідини буде дорівнювати $(80+160) / 2 = 120$ одиниць розведення.

Під час вирощування актиноміцета на рідких середовищах декілька разів треба проводити визначення активності культуральних рідин у терміни, вказані вище. Це дозволить охарактеризувати динаміку накопичення антибіотика на різних середовищах і за різних умовах культивування актиноміцета. Отримані дані заносять до табл. 3.

Таблиця 3

Антибіотична активність актиноміцета на рідких середовищах

№ п/п	Середовище	Умови культивування	Строки відбору (доба)	Титр антибіотичної активності (розведення)
1	Чапека	Поверхнєве	5	1:10
			7	1:40
			10	1:160
2	Соєве	Глибинне	4	1:20
			7	1:80
3	Крохмально-	Глибинне	4	1:40

	соєве		7	1:320
--	-------	--	---	-------

На закінчення необхідно зазначити, в яких умовах і на якому середовищі виявлена в досліджуваній культурі актиноміцета найбільш висока продукція антибіотика.

4. Первинна ідентифікація антибіотика та його продуцента

Після того як виділили штам актиноміцета, що має антибіотичні властивості, необхідно встановити, чи є виділений штам продуцентом нового, ще не описаного антибіотика, чи ж він синтезує вже відому речовину. Найбільш поширеним у практиці біологічним методом первинної ідентифікації антибіотика та його продуцента є метод перехресного антагонізму, який уперше був розроблений М.О. Красильниковим.

Основні особливості перехресного антагонізму такі:

1. У присутності антибіотика А (за умови, що його доза цілком достатня) пригнічений розвиток актиноміцета вказує на те, що цей організм виділяє антибіотик В, відмінний від антибіотика А. Однак існують винятки.

2. У присутності антибіотика А розвиток актиноміцета, що виділяє цей антибіотик, не затримується в межах визначених доз цього антибіотика.

Для постановки даного експерименту необхідно підготувати кружки і смужки, чашки Петрі з живильним агаром і суспензію спор.

Стерилізація кружків і смужок паперу.

1. Кружки паперу треба опромінити протягом 24 год бактерицидними променями ультрафіолетової лампи.

2. Смужки паперу необхідно стерилізувати у автоклаві при температурі 115°C протягом 30 хв.

Готування чашок Петрі. Розплавлений живильний агар слід стерильно розливати по стерильних чашках Петрі з розрахунком по 20 мл на чашку. Чашки помістити на строго горизонтальну поверхню. Чашки з агаром можна використовувати через 48 год підсушування при кімнатній температурі. За цей проміжок часу конденсаційна вода встигне випаруватися, а також проявиться випадкове забруднення. Якщо чашки заражені, то під час досліду вони не використовуються.

Готування суспензії спор. Спори молоді культури досліджуваного штаму актиноміцета суспендуються в стерильній дистильованій воді. Густина суспензії повинна бути така, щоб мутність її можна було легко визначити на око.

Постановка досліду: за допомогою препарувальної голки паперовий диск проколоти у центрі. Диск нижньою стороною помістити в розчин антибіотика визначеної концентрації, для видалення надлишку вологи слід його покласти між двома аркушами стерильного пергаментного паперу, а потім перенести в центр чашки Петрі на живильний агар.

Через годину після цього 2 смужки паперу, змочені суспензією спор досліджуваного актиноміцета, розкладають по радіусах чашки (кінець паперової смужки повинен знаходитися безпосередньо біля паперового кружка). Через годину смужку знімають, а чашку витримують 3 дні при температурі 28⁰С.

Контроль активності розчину антибіотика. Крім смужки актиноміцета, варто також засіяти смужку штамом мікроба, чутливого до дії найголовніших відомих антибіотиків. Для цього по радіусу чашки проводять смужку за допомогою ватяного тампона, змоченого суспензією 24-годинної культури *Salmonella pullorum*, *St. aureus* або ін.(розведення 1:1000). Довжина зони затримки росту визначає активність антибіотика.

У ході визначення результатів може бути два варіанти:

а) антибіотик, наявний у паперовому диску, не затримує розвиток досліджуваного актиноміцета. Смужка міцелію розвивається в безпосередньому контакті з паперовим диском, а іноді навіть заходить на диск;

б) антибіотик, наявний у диску, затримує розвиток досліджуваного актиноміцета. Розвиток смужки міцелію відбувається лише на деякій відстані від диска. За допомогою циркуля визначають розмір зони, у якій розвиток культури повністю затриманий.

Кожну чашку необхідно засівати одним видом актиноміцета, тому що наявність в одній і тій же чашці штамів, що виділяють різні антибіотики, може призвести до неправильних результатів.

На підставі вивчення актиноміцетів за методом перехресного антагонізму запропонований спеціальний дихотомічний ключ, за допомогою якого можна встановити антибіотик, який виділяється визначеним штамом актиноміцету, а також віднести ці організми до визначеного біотипу (рис. 1).

На рис. 1 вихідним моментом є стрептоміцин, яким просочувалися паперові диски. Потім послідовно йдуть інші антибіотики. (Однак може бути застосоване будь-який інший порядок розташування антибіотиків.)

Під назвою «антибіотик Х» мається на увазі штам актиноміцету, що виділяє або відомий, але невивчений антибіотик, або ж невідомий антибіотик.

Приклади, наведені нижче, показують, як треба застосовувати цей ключ (рис. 1).

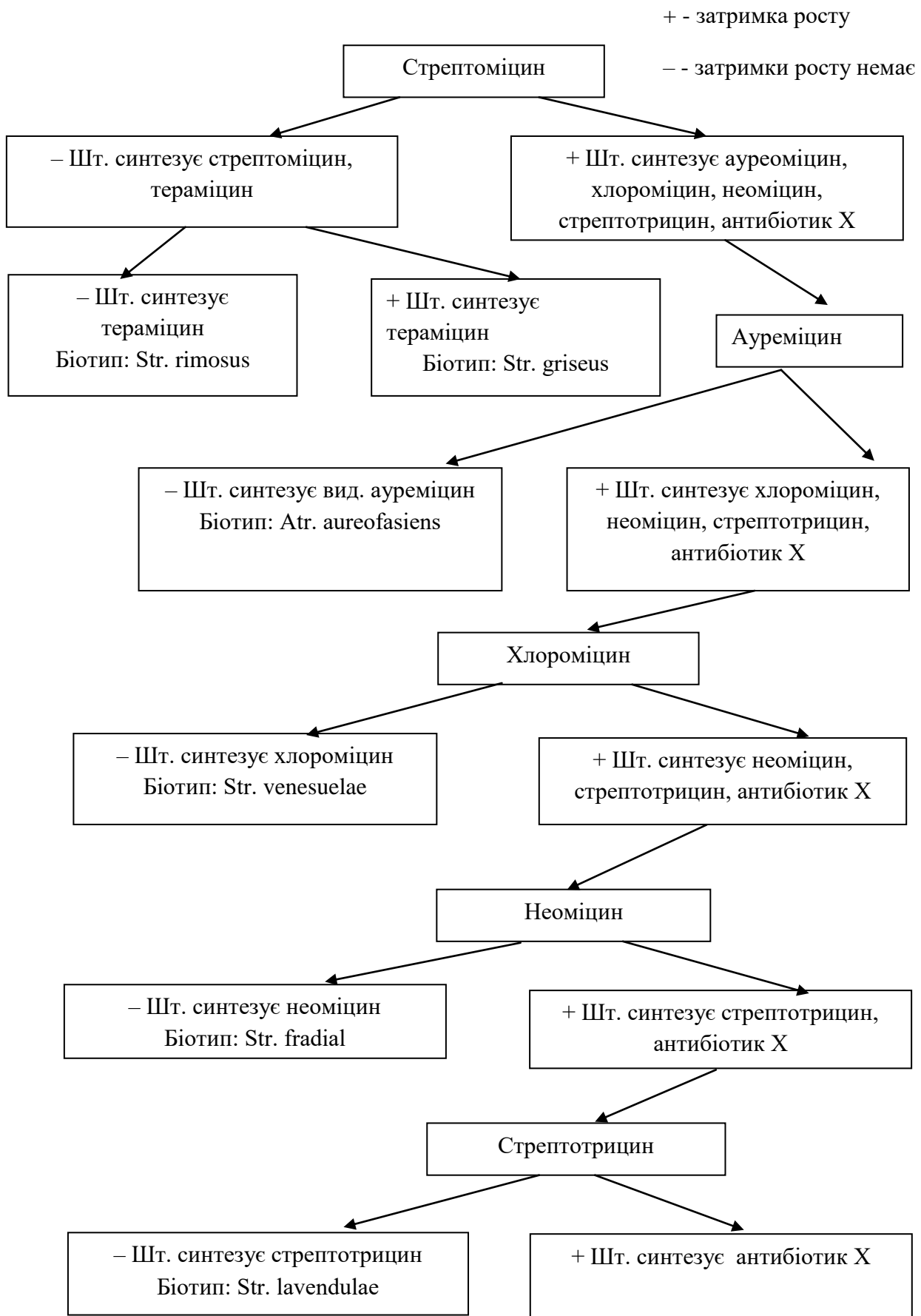


Рис.1. Загальна схема виділення невідомого антибіотика

Приклад 1. Розвиток актиноміцета за наявності стрептоміцину не затримується. Отже, це штам, що виділяє стрептоміцин. Цей штам висівають разом із тераміцину. Якщо тераміцин затримує розвиток цього штаму, то це актиноміцет, що виділяє стрептоміцин, і штам може належить до біотипу *Actinomyces griseus*.

Приклад 2. Стрептоміцин затримує розвиток досліджуваного штаму актиноміцета. У такому випадку це штам, що виділяє або ауреоміцин, або хлорміцетин, або неоміцин, або стрептотріцин, або, нарешті, антибіотик X.

Цей штам висівають за наявності ауреоміцину. Розвиток його затримується, отже, штам актиноміцету виділяє хлороміцетин, або стрептотріцин, або антибіотик X. Штам знову висівають, але вже разом із хлороміцетином: у даному випадку він розвивається нормально. Отже, це актиноміцет який виділяє хлороміцетин і належить до біотипу *Act. venezuelae* і т.д.

Користуючись цим ключем, на підставі відсутності або наявності затримки росту можна визначити, чи належить антибіотик до одного з декількох антибіотиків, використаних у цьому ключі, або ж відмінний від них.

Необхідно побудувати діаграму або графік, за результатами визначення середніх величин затримки росту цього штаму за наявності різних антибіотиків. Діаграми для різних біотипів не мають нічого спільного між собою. Плутати їх не можна.

Завдання:

1. Виділити антагоністичні форми актиноміцетів у різних ґрунтових зразках за такими методами: а) висіву ґрунтової бовтанки на поверхню живильних середовищ; б) скупченого висіву; в) висіву ґрунту на газон; г) збагачення ґрунту; д) бактеріальних агарових пластинок.
2. Визначити антимікробний спектр чистих культур виділених актиноміцетів-антагоністів.
3. Вивчити біосинтез антибіотичних речовин виділених актиноміцетів в умовах поверхневого й глибинного культивування.
4. Провести первинну ідентифікацію актиноміцетів.

Контрольні питання:

1. Як проводиться відбір ґрунтових зразків?
2. Які поживні середовища використовуються для виділення мікробів-антагоністів?
3. Як проводиться виділення актиноміцетів із ґрунту?
4. Якими методами можна вивчати антагоністичні властивості актиноміцетів?
5. Якими методами здійснюється перевірка культур, що вирости, на їх антибіотичну активність ?
6. Суть методу бактеріальних агарових пластинок.

7. Яким чином здійснюється виділення чистих культур актиноміцетів – продуцентів антибіотиків?
8. Яким способом визначається антимікробний спектр виділених чистих культур актиноміцетів?
9. Принцип методу агарових блочків?
10. Які мікроорганізми досліджуються як тест-об'єкти при визначенні спектру антагоністичної дії кожної досліджуваної культури актиноміцету?

Лабораторна робота № 2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АКТИНОМІЦЕТІВ

Мета: провести ідентифікацію виділених культур актиноміцетів.

Прилади і матеріали: мікроскоп МБІ-1, фазово-контрасний мікроскоп, предметні і накривні скельця, імерсійна олія, бактеріологічна петля, чашки Петрі з середовищем Гаузе, рідина Карнау, спирт, метиленовий синій, розчин Люголя. Середовища для досліджуваних актиноміцетів – картопля, желатин, молоко, клітковина, крохмальний агар, рідкі середовища з нітратами й сахарозою.

Теоретичні відомості

Ідентифікація представляє собою визначення видової або типової приналежності мікроорганізму. Ідентифікація актиноміцетів базується на сукупності даних про морфологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні і серологічні ознаки. Важливими характеристиками також є їх антагоністичні властивості та особливості синтезованих антибіотиків.

Хід роботи

З метою ідентифікації кожен студент повинен вивчити морфологію, культуральні й фізіолого-біохімічні властивості двох штамів актиноміцетів. Досліджувані культури висівають у вигляді штриха на поверхню двох агаризованих середовищ, розлитих у чашки Петрі.

Середовище Гаузе №1
з мінеральним джерелом азоту:

KNO_3 – 1,0 г/л

K_2HPO_4 – 0,5 г/л

MgSO_4 – 0,5 г/л

NaCl – 0,5 г/л

FeSO_4 – 0,01 г/л

крохмаль – 20,0 г/л

агар-агар – 30,0 г/л

Середовище Гаузе №2
з органічним джерелом азоту:

бульйон Хоттингера – 30,0 г/л	глюкоза – 10,0 г/л
пептон – 5,0 г/л	агар-агар – 30,0 г/л
NaCl – 5,0 г/л	

Посіви треба інкубувати в термостаті при 28 °С і щодня проглядати протягом двох тижнів.

Морфологічні ознаки вивчають у процесі росту культури, а також на живих культурах, що виростили на синтетичному середовищі Гаузе 1 або на фіксованих препаратах.

У процесі росту культури протягом двох тижнів необхідно щодня визначати наступні ознаки:

- час прояву росту на цих середовищах;
- особливості субстратного міцелію;
- забарвлення субстратного міцелію;
- утворення розчинних пігментів (забарвлення середовища);
- час появи повітряного міцелію, його забарвлення.

На підставі цих властивостей треба встановити приналежність досліджуваних культур актиноміцетів-антагоністів до визначеної серії відповідно до класифікації актиноміцетів Г.Ф. Гаузе.

Серії актиноміцетів

Таблиця 4

№ п/п	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Назва серії
1	Рожево-бузковий	Безбарвний	Lavendulaeroseus
2	Рожевий	Жовтий	Fradiae
3	Рожевий	Бурий	Fuscus
4	Ясно-рожевий	Фіолетовий	Roseaidaceus
5	Рожевий	Червоний	Ruber
6	Жовтувато-зелений або палевий	Безбарвний або пофарбований	Helvolus
7	Білий	Безбарвний	Albus
8	Білий	Червоний або бурий	Albosporeus
9	Голубий або зеленувато-голубий	Безбарвний або пофарбований	Coerulescens
10	Сірий	Безбарвний	Griseus
11	Сірий, потім чорний (автоліз)	Безбарвний	Nigrescens
12	Сірий	Жовтий	Aureus
13	Сірий	Зеленувато-бурий	Chrysoviallus
14	Сірий	Коричнево-чорний	Chromogenes

15	Сірий	Синьо-фіолетовий або червоно-бурий	Violaceus
----	-------	------------------------------------	-----------

Під час визначення виду велике діагностичне значення мають морфологічні ознаки: будова спороносців (спірально-бокільчасті). Форма спор (сферичні, овальні, циліндричні, довгасті), способи утворення (фрагментація або сегментація).

Морфологічні ознаки вивчають на живих культурах, що виростили на синтетичному середовищі Гаузе №1 або у фіксованих препаратах.

Дослідження живих культур. Вивчають 1–2 – добові посіви культур на агаризованому середовищі №1. З цією метою на поверхню засіяного середовища треба покласти накривне скло, на яке нанести краплю імерсійної олії. Цитологічне дослідження проводиться за допомогою фазово-контрасного мікроскопа. Необхідно звернути увагу на структуру мікроколоній, товщину ниток, форму спороносців, спори.

Для прижиттєвого вивчення можна приготувати препарат за Пешковим: на тонке предметне скло треба нанести розплавлене агаризоване середовище, яке засіяти суспензією спор актиноміцету, приготувати спеціальну камеру, що уміщують у чашці Петрі до термостата. Через 6-12 год інкубації можна спостерігати характер проростання спор, утворення мікроколоній; через 24-48 год – форму спороносців і спор.

Дослідження актиноміцетів у фіксованих і пофарбованих препаратах

З культур актиноміцетів, які добре виростили на агаризованих середовищах (5-7 - добові), треба приготувати мазки-відбитки. З цією метою з агару з нальотом актиноміцета необхідно вирізати блок, який перенести на предметне скло. До поверхні блоку з культурою кілька разів прикласти знежирене предметне скло – виходить 3-4 послідовні відбитки. Після підсихання відбитки фіксуються. Фіксацію препарату здійснюється рідиною Карнуа (6 частин спирту (96⁰), 3 частини хлороформу, 1 частина холодної оцтової кислоти) протягом 5 хв, потім препарат треба сполоснути спиртом (70⁰) і пофарбувати водним розчином метиленового синього (1:1000). Слід звернути увагу на те, що цитоплазма набуває інтенсивно синього кольору в молодих гіфах і блідо-голубого – у зрілих, ядерні елементи – блакитні або сині, волютинові зерна – вишневі, фіолетові або рожеві. У препараті вивчають будову спороносців і спор.

Дослідження актиноміцетів у фіксованих і пофарбованих препаратах

З культур актиноміцетів, які добре виростили на агаризованих середовищах (5-7 - добові), треба приготувати мазки-відбитки. З цією метою з агару з нальотом актиноміцета необхідно вирізати блок, який перенести на предметне скло. До поверхні блоку з культурою кілька разів прикласти знежирене предметне скло – виходить 3-4 послідовні відбитки. Після підсихання відбитки фіксуються. Фіксацію

препарату здійснюється рідиною Карнуа (6 частин спирту (96⁰), 3 частини хлороформу, 1 частина холодної оцтової кислоти) протягом 5 хв, потім препарат треба сполоснути спиртом (70⁰) і пофарбувати водним розчином метиленового синього (1:1000). Слід звернути увагу на те, що цитоплазма набуває інтенсивно синього кольору в молодих гіфах і блідо-голубого – у зрілих, ядерні елементи – блакитні або сині, волютинові зерна – вишневі, фіолетові або рожеві. У препараті вивчають будову спорноносців і спор.

Для вивчення культуральних та біохімічних властивостей проводять посів досліджуваних актиноміцетів на ряд середовищ: картоплю, желатин, молоко, клітковину, крохмальний агар, рідкі середовища з нітратами й сахарозою, склад яких наведений нижче.

Желатин:

желатин	- 100,0 г/л
пептон	- 5,0 г/л
глюкоза	- 20,0 г/л
pH	- 7,0

Крохмальний агар:

розчинний крохмаль	- 10,0 г/л
K ₂ HPO ₄	- 0,3 г/л
MgSO ₄	- 1,0 г/л
NaCl	- 0,5 г/л
CaCO ₃	- 3,0 г/л
агар-агар	- 20,0 г/л
pH	- 7,2-7,4

Клітковина:

Смужки фільтрувального паперу треба залити у пробірках розчином такого складу:

K ₂ HPO ₄	- 0,5 г/л
MgSO ₄	- 0,5 г/л
KNO ₃	- 1,0 г/л
NaCl	- 0,5 г/л
FeSO ₄	- 0,01 г/л
pH	- 7,2-7,4

Нітрати:

Пептон	- 1,0 г/л
KNO ₃	- 1,0 г/л
NaCl	- 0,5 г/л
pH	- 7,0

Сахароза:

K ₂ HPO ₄	- 0,5 г/л
MgSO ₄	- 0,5 г/л
KNO ₃	- 1,0 г/л
NaCl	- 0,5 г/л
FeSO ₄	- 0,01 г/л
сахароза	- 20,0 г/л

Необхідно переглядати й описувати культури на всіх середовищах через кожні 5 днів протягом 3-4 тижнів.

На картоплі вивчають:

- характер росту;
- колір повітряного і субстратного міцелію;
- зміни кольору картоплі.

При вирощуванні актиноміцетів на молоці слід звернути увагу на його зміни: згортання або пептонізація, а також відмітити час появи цих змін.

На желатині визначають розрідження та його характер: кратероподібне, пошарове і мішкоподібне.

Гідроліз крохмалю визначається на 10 – 15 добу вирощування. Із цією метою чашки з вирощеним посівом треба залити розчином Люголя – відсутність посиніння навколо штриха вказує на гідроліз крохмалю, величина цієї зони виміряється в мм.

Відновлення нітратів на нітрити проявляється на 15-20-ту добу за допомогою реактиву Грисса. До 1 мл гарячого реактиву Грисса слід додати 10 мл досліджуваної рідини, суміш прокип'ятити на пальнику. Почервоніння вказує на наявність нітритів.

Реактив Грисса:

1. 0,5 мл сульфанілової кислоти розчиняють у 150 мл 12%-ї оцтової кислоти. (12%-й розчин оцтової кислоти – 22,5 мл 80%-ї оцтової кислоти + 127,5 мл дистильованої води);

2. 0,1 мл α -нафтиламіну кип'ятять у 20 мл води і додають 150 мл 12%-ї оцтової кислоти;

3. Перед постановкою досліду зливають по 1 мл кожен із розчинів і кип'ятять.

Інверсію сахарози визначають на 15-20-ту добу росту . Реактиви Фелінга 1 і 2 зливають у різних об'ємах, суміш прокип'ячують. До 2 мл суміші реактивів додають 2 мл досліджуваного середовища, у результаті підігрівання випадає червоний або жовтий осад окису міді, що вказує на наявність глюкози.

На підставі даних, отриманих у процесі вивченні актиноміцетів-антагоністів, необхідно з'ясувати їх видову приналежність, застосовуючи визначник «Питання класифікації актиноміцетів-антагоністів» (див. список рекомендованої літератури).

Завдання:

1. Встановити приналежність досліджуваних культур актиноміцетів-антагоністів до відзначеної серії відповідно до класифікації актиноміцетів Г.Ф. Гаузе.
2. На основі дослідження морфологічних, культуральних, біохімічних ознак встановити їх родову та видову приналежність, застосовуючи визначник актиноміцетів Гаузе («Питання класифікації актиноміцетів-антагоністів»).

Контрольні питання:

1. На чому базується ідентифікація мікроорганізмів?
2. Які морфологічні ознаки застосовують при ідентифікації актиноміцетів?
3. На підставі яких властивостей встановлюють приналежність досліджуваних культур актиноміцетів до певної серії?
4. Які діагностичні середовища застосовують при ідентифікації актиноміцетів?
5. Фізіолого-біохімічні властивості актиноміцетів.

Лабораторна робота № 3

ПАПЕРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ АНТИБІОТИКІВ

Мета: дослідити хроматографічні спектри ряду антибіотиків.

Прилади і матеріали: хроматографічний папір, циліндри з притертими пробками для хроматографування, системи розчинників, агарові пластинки, засіяні

тест-мікробом – *B. subtilis* 6633, 0,5% розчин метиленової сині і 20% розчин водного гліцерину, 0,5 N спиртовий розчин їдконого натрію.

Теоретичні відомості

Метод паперової хроматографії застосовують на різних етапах вивчення антибіотиків: його однорідності, властивостей, очищення препарату, перетворень антибіотика, ідентифікації тощо. Кожен антибіотик у певній системі розчинників має свій визначений коефіцієнт розподілу на папері (R_f). Характерною особливістю застосування хроматографії на папері для класифікації антибіотиків є використання стандартних наборів розчинників, однакових для всіх антибіотиків незалежно від їх хімічної природи.

Для ідентифікації антибіотиків розроблені й запропоновані декілька типів наборів розчинників. У ходівивченняхроматографічного спектра антибіотиків часто застосовуютьсистемирозчинників де Бера, Гуксеми, Шевченка та ін. У процесівиконанняданоїроботивикористовуються два типи системирозчинників.

Система розчинників Д. Доскочилова й М.Вондарек.

- 1) н-бутанол, насичений водою;
- 2) н-бутанол, насичений водою з 2% поротолуолсульфакислоти;
- 3) н-бутанол – оцтова кислота – вода (2:1:1);
- 4) н-бутанол, насичений водою з 2% піперидину;
- 5) 0,5 М фосфатного буфера, рН – 7,0, насиченого бутанолом;
- 6) вода, насичена бутанолом з 2% паратолуолсульфокислоти;
- 7) бензол-метанол (4:1), папір просочений 0,5 М фосфатного буфера;
- 8) 75% метанолу – 25% води, яка містить 3% хлористого натрію, папір просочений 5% Na_2SO_4 .

Системи розчинників М.О. Блинова:

- 1) бензол, насичений водою;
- 2) хлороформ, насичений водою;
- 3) дізоаміловий ефір, насичений водою;
- 4) діетиловий ефір, насичений водою;
- 5) етилацетат, насичений водою;
- 6) ацетон;
- 7) н-бутанол, насичений водою;
- 8) вода, насичена н-бутанолом;
- 9) 3%-й хлористий амоній;
- 10) н-бутанол, насичений водою + 2% піперидину;
- 11) н-бутанол – піридин – вода (1:0,6:1);
- 12) н-бутанол, насичений водою + 2% п-толуолсульфокислоти;
- 13) н-бутанол – оцтова кислота – вода (2:1:1).

Як досліджувані препарати вивчають розчини різних антибіотиків: тетрацикліну, стрептоміцину, еритроміцину, левоміцетину, граміцидину, а також культуральних рідин.

Хід роботи

Кожен студент отримує індивідуальне завдання – зашифрований препарат.

На смугу хроматографічного паперу розміром 2×50 см треба нанести досліджуваний розчин по 0,05 – 0,1 мл на стартову лінію довжиною 4 см від нижнього кінця смуги при лінії занурювання – 2 см. Лінія фронту – 20 см. Хроматографування необхідно проводити в циліндрах з притертими пробками. Хроматограми знімати тоді, коли фронт розчинника підніметься на 20 см вище лінії старту, висушити на повітрі й проявити за біоавтографічним методом.

Біоавтографічний метод виявлення антибіотиків

Метод полягає у тому, що хроматограми накладаються на агарові пластинки, засіяні тест-мікробом. Через добу інкубації в термостаті в місцях локалізації антибіотика відсутній ріст тест-культури. У разі застосування біоавтографічного методу використовуються лотки. Їх перед роботою протирають спиртом і обпалюють. Дно лотка заливають шаром агару, а після застигання його поверхню заливають тонким шаром бактеріального агару (на 100 мл розтопленого й охолодженого до 45°C агару вносять 1 мл суспензії тест-мікроба, густиною 1 млрд/мл).

Як тест-мікроб використовують *B. subtilis* 6633. Хроматограми розміщують на поверхні бактеріального агару. Після двочасової інкубації на холоді хроматограми знімають, лоток переносять до термостата. Через 1 добу проводять облік результатів. Необхідно приготувати відбитки зон пригнічення тест-мікроба з агарових пластинок на фільтрувальному папері. З цією метою агарові пластинки заливають 0,5%-ним розчином метиленової сині в 20%-ному водному гліцерині. Надлишок розчину зливають на агар, наливають 0,5 N спиртового розчину їдкою натрію. Потім цей розчин зливають, надлишок рідини відокремлюється, потім з поверхні обробленої агарової пластинки роблять відбиток на фільтрувальному папері. Отриманий відбиток висушують, на ньому відображаються смуги хроматограм, відмічається лінія старту, фронт розчину, зона пригнічення росту тест-мікроба. Необхідно виміряти відстань від старту до середини зони на кожній хроматогамі й обчислити значення R_f (відношення відстані від старту до середини зони й відстані від старту до фронту). За одержаними даними треба побудувати графік, де на осі ординат відкласти значення R_f , а на осі абсцис – номери систем розчинників. Хроматографічний спектр досліджуваного препарату необхідно порівняти з хроматографічними спектрами антибіотиків, вивчених Д. Доскочилвим, М. Водрочек, М. Блиновим, О. Хохловим.

Результати досліджень оформити у вигляді звіту.

Завдання:

1. Вивчити хроматографічні спектри ряду антибіотиків.
2. Визначити, до якої групи антибіотиків належить досліджуваний препарат і, застосовуючи ключ даної групи, встановити його природу.

Контрольні питання:

1. На яких етапах вивчення антибіотиків застосовується метод паперової хроматографії?
2. Що таке хроматографічний спектр антибіотика?
3. У чому полягає біоавтографічний метод виявлення антибіотиків.
4. Области застосування паперової хроматографії при вивченні антибіотиків.

Лабораторна робота № 4

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

Мета: дослідити чутливість ряду бактерій до антибіотиків методом дифузії в агар і методом мінімальної пригнічувальної концентрації.

Прилади і матеріали: чашки з МПА, пробірки з МПБ, диски з антибіотиками, розчини досліджуваних антибіотиків певної концентрації, бактеріологічна петля, шпатель, пінцети.

Теоретичні відомості

Антибіотики мікробного походження знайшли широке застосування в медичній практиці. Для виявлення антибіотика, необхідного під час лікування того чи іншого захворювання, застосовують дифузійний метод. У наш час існують дві основні модифікації дифузійного методу: диско-дифузійний та Е-тест. Принцип диско-дифузійного методу полягає в тому, що паперові диски, насичені розчинами різних антибіотиків, накладають на живильне агаризоване середовище, засіяне досліджуваною культурою. Антибіотик на вологій поверхні дифундує в агар і припиняє ріст мікроорганізмів, якщо вони чутливі до нього. Тоді навколо диска утворюється так звана “стерильна зона”, або “зона затримки росту”.

Ступінь чутливості бактерій до антибіотика визначається розміром стерильної зони: чим вона більша, тим чутливіші бактерії до досліджуваного антибіотика.

Однак, диско-дифузійний метод дозволяє лише побічно судити про величину МПК, а результатом досліджень є віднесення мікроорганізмів до однієї із категорій чутливості (чутливий, проміжний або резистентний).

Е-тест. Визначення чутливості мікроорганізму за допомогою Е-тесту проводиться аналогічно тестуванню диско-дифузійним методом. Відмінність полягає в тому, що замість диска з антибіотиком використовуються смужки Е-тесту, що являє собою вузьку смужку полімеру (0,5×6,0 см), на яку нанесено градієнт концентрацій антибіотика від мінімальної до максимальної. Значення концентрації АБ на кожній ділянці носія нанесені на зовнішній (повернутій до дослідника) поверхні Е-тесту. Пригнічення росту мікроорганізму навколо смужки Е-тесту відбувається тільки в тій зоні, де концентрація АБ, що дифундує з носія, дорівнює і вище МПК, при цьому утворюється краплеподібна зона інгібіції (рис. 2). За величину МПК приймають значення концентрації в тому місці, де межа зони пригнічення росту впритул підходить до носія.

Безсумнівною перевагою дифузійних методів є простота тестування і доступність виконання. Однак, через високу вартість Е-тестів для рутинної роботи зазвичай використовують диско-дифузійний метод.

Оцінка антибіотичної чутливості незалежно від кожного методу передбачає послідовне виконання декількох етапів:

- приготування живильних середовищ;
- приготування суспензії мікроорганізмів (інокулюма);
- інокуляція;
- інкубація;
- облік та інтерпретація результатів.

Хід роботи

Визначення активності антибіотиків методом дифузії в агар.

Розплавлене живильне середовище (МПА) стерильно розлити в стерильні чашки Петрі. Поки середовище застигає, підготувати суспензію досліджуваної бактеріальної культури. 2-3 краплі суспензії перенести стерильною піпеткою з пробірки на поверхню твердого середовища. Для рівномірного росту розтерти суспензію бактерій по поверхні середовища в чашці стерильним шпателем (посів "газоном"). Диски антибіотиків покласти на поверхню МПА профламованим пінцетом. На кожен чашку покласти не більше 5-6 дисків різних антибіотиків. Підписати чашки й поставити в термостат, температура в якому 30°C.

Розглянути чашки і вказати наявність стерильних зон навколо індикаторних дисків. Виміряти лінійкою діаметр стерильних зон. Результати занести до табл.

Досліджувана культура бактерій	Діаметр стерильної зони, мм				
	Диски антибіотиків				

Високочутливими до досліджуваного антибіотика вважають мікроорганізми, зона затримки росту яких навколо диска антибіотика перевищує 25 мм, чутливими – 15-25 мм, малочутливими – 11-15 мм.

Метод серійних розведень у рідкому середовищі.

Одним із методів визначення активності антибіотиків є встановлення мінімальних концентрацій, необхідних для повного пригнічення росту даної бактерії. Їх називають мінімальними пригнічувальними концентраціями (МПК) і визначають таким чином:

1. Готують декілька пробірок, які містять однаковий об'єм середовища, інкульований тест-бактерією (від 10^3 до 10^6 бактерій у 1 мл).
2. У пробірки додають антибіотик у концентраціях, які зменшуються. Звичайно використовують ступеневе двократне розведення (тобто, якщо концентрація в першій пробірці дорівнює 1 мг/мл, у другій – 0,5 мг/мл, у третій – 0,25 мг/мл і т.д.). В одну пробірку антибіотик не додають, вона вважається контролем росту бактерій.
3. Культури інкубують у термостаті при температурі, оптимальній для тест-бактерій, протягом часу, достатнього для того, щоб пройшло не менше 10-15 генерацій (18-20 год).
4. Пробірки проглядають, щоб визначити, де виростили бактерії: вміст таких пробірок стає мутним. Помутніння середовища вказує на присутність великої кількості бактерій. Пробірки, в яких антибіотик знаходиться в достатньо високих концентраціях, щоб пригнітити ріст бактерій, залишаються прозорими. МПК відповідає концентрації антибіотика в останній прозорій пробірці.

Кожен антибіотик і кожен вид бактерій характеризуються при даних умовах визначення своєю величиною МПК.

На визначення активності антибіотика *in vitro* впливають такі фактори, як склад середовища, густина інкулюма, кількість бактеріальних клітин в інкулюмі.

Визначення бактеріоциногенної активності мікроорганізмів

Визначення бактеріоциногенної активності бактерій проводять для внутрішньовидової диференціації з епідеміологічною метою.

На чашки з відповідним живильним середовищем сіють уколом добувагару або 4-годинну бульйонну досліджувану культуру й кладуть на 48 год у термостат при температурі 37°C. Інактивують ріст макроколоній, які вирости, хлороформом або УФ-променями. Потім заливають поверхню агару 4 мл 0,7%-го МПА з 0,2 мл 4-годинної бульйонної культури еталонного штаму, чутливого до бактеріоцинів даного виду. Посів ставлять у термостат при температурі 37°C на добу.

Наявність зон затримки росту еталонних культур свідчить про продукцію бактеріоцинів. Використання певних еталонних продуцентів або штамів, чутливих до відповідних бактеріоцинів, дозволяє встановити бактеріоциновар бактерій, які вивчаються.

Завдання:

1. Визначити чутливість досліджуваних бактерій до антибіотиків методом дифузії в агар.
2. Визначити чутливість бактерій до антибіотиків методом мінімальної пригнічувальної концентрації в рідкому середовищі (МПК).
3. Визначити мінімальну бактерицидну концентрацію.

Контрольні питання:

1. На яких принципах ґрунтуються біологічні методи кількісного визначення антибіотиків?
2. У яких одиницях визначається активність антибіотиків?
3. Принцип методу дифузії в агар при дослідженні чутливості бактерій до антибіотиків.
4. Які вимоги ставляться до тест-культур, які використовують для визначення кількості антибіотиків?
5. Які умови дають змогу отримати найточніші результати у визначенні активності антибіотиків біологічними методами?
6. Як визначається мінімальна пригнічуюча концентрація у рідкому середовищі?
7. Як поділяють мікроорганізми за ступенями їх чутливості до антибіотиків?
8. Суть методу мінімальної бактерицидної концентрації.

ВИЗНАЧЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАЦИЛ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ТЕСТ-КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета: Визначити антагоністичну активність різних пробіотичних штамів по відношенню до тест культур мікроорганізмів

Прилади і матеріали: чашки з МПАта середовищем "Лактобакагар", пробірки з МПБ, бактеріологічна петля, стерильні пробірки та піпетки, шпатель, культури мікроорганізмів: *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *C. albicans*, *E. coli*, *A. niger* як тест-об'єкти, пробіотичні штами *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. plantarum*, *L. lactis*.

Теоретичні відомості

Пробіотики в сучасних умовах займають провідне місце в профілактиці та комплексній терапії ряду захворювань.

Пробіотики - препарати, що містять живі клітини мікроорганізмів або продукти їх метаболізму, які сприятливо впливають на організм людини шляхом оздоровлення її мікрофлори. Дія цих препаратів заснована на явищі мікробного антагонізму. Пробіотичні препарати інгібують ріст інших умовно-патогенних мікроорганізмів в результаті конкуренції за джерела харчування, змінюють рН, продукують антимікробні фактори, інгібуючи ріст мікроорганізмів. Особливу увагу останнім часом приділяють пробіотикам, до складу яких входять бактерії роду *Bacillus*. Препарати спороутворюючих бактерій не поступаються ефективністю, а іноді є більш ефективними ніж традиційні пробіотики у профілактиці захворювань шлунково-кишкового тракту. *Bacillus* sp. - це транзиторні мікроорганізми, які володіють широким спектром біологічної активності і тому мають великі перспективи для використання в якості біопрепаратів. Вони проявляють високу антагоністичну активність відносно багатьох патогенних бактерій і при цьому не пригнічують нормофлору, завдяки чому створюються умови для безконкурентного відновлення мікрофлори. Антагоністична дія бацил обумовлена продукцією різних за природою біологічноактивних речовин, лізоциму, літичних ферментів, поліпептидних антибіотиків, і одночасно ферменти (каталаза, субтілізин) стимулюють ріст лактобацил.

Для визначення антагоністичної активності пробіотичних штамів використовують метод відстроченого антагонізму та метод дифузії в агар.

Хід роботи

Визначення антагонізму пробіотичних штамів методом відтермінованого антагонізму.

Реалізація цього методу полягає в тому, що суміш штамів *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* (які входять до складу пробіотика Біоспорину) вирощують протягом доби при температурі 37°C до появи окремих макроколоній на чашках МПА. Перед використанням суспензії тест-культур (індикаторних штамів)

підрощують 6 годин у МПБ при 37°C. Макроколонії досліджуваних культур, які вирости на чашках Петрі, обробляють парами хлороформу 50 хвилин, далі підсушують на повітрі під кварцевою лампою протягом 50 хвилин. Свіжі бульйонні культури індикаторних штамів у кількості 0,1 мл змішують з 5,0 мл 0,7% розплавленого та охолодженого до 45°C МПА. Попередньо підготовлені культури на пластинках агару заливають даною сумішшю і швидко розподіляють її по поверхні агару з колоніями. Чашки Петрі інкубують протягом 24 годин при 37°C. Після інкубації проводять облік результатів. Якщо помітна зона інгібування тест-індикатора, то вважається, що пробіотичний штам проявляє антагоністичну активність.

Рівень антагоністичної активності бацил виражають умовно як низький, середній та високий. Індикаторні зони діаметром від 7 до 16 мм говорять про низький рівень антагоністичної активності. Середній рівень активності відповідає зонам затримки діаметром 7 - 26 мм. Про високий рівень антагоністичної активності свідчать зони затримки діаметром 27 - 36 мм. Дані про рівень антагоністичної активності штамів бацил заносять у таблицю.

Антагоністична активність пробіотичних штамів бацил

Пробіотичні штами	Значення зон затримки росту тест-культур мікроорганізмів, мм					
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>M. luteus</i>
<i>B. subtilis</i>						
<i>B. licheniformis</i>						

Визначення антагоністичної активності штамів лактобацилло відношенню до тест-культур мікроорганізмів за методикою перпендикулярних штрихів

Метод перпендикулярних штрихів дуже широко використовується у мікробіології. На поверхню чашки Петрі з середовищем "Лактобакагар" проводять посів штрихом суспензії мікроорганізмів (1 млрд / мл) досліджуваного штамів лактобацил, виділеної із пробіотичного препарату. Посів здійснюють по діаметру чашки Петрі на інкубують при оптимальній температурі (37°C) протягом певного часу (72 години) для утворення та дифузії в агар.

Після росту пробіотичного штамів роблять штрихові посіви різних тест-мікроорганізмів. У якості тест-об'єктів використовують такі мікроорганізми: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*.

Для визначення антагоністичної активності пробіотичного штамів із указаних культур готують суспензії, що містять 1 млрд мікробних клітин у 1 мл. Суспензії тест-культур перпендикулярно підсівають з обох боків від штриха росту пробіотичного штамів. Чашки інкубують у термостаті при температурі 37°C. У ході аналізу результатів визначають антагоністичну дію пробіотичного штамів. Тест-об'єкти, нечутливі до антагоністичних речовин, ростуть біля краю штриха, а чутливі мікроорганізми розвиваються на більшій чи меншій відстані від штриха росту досліджуваної культури. Для оцінки чутливості кожного тест-об'єкта

необхідно виміряти в міліметрах величину зони пригнічення його росту. Дані про рівень антагоністичної активності заносять у таблицю.

Антагоністична активність пробіотичних штамів лактобацил

Штама лактоба цил	Значення зон затримки росту тест-культур мікроорганізмів, мм					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. lactis</i>						

Завдання:

1. Визначити антагоністичну активність пробіотичних штамів бацил: *B. subtilis* та *B. licheniformis* методом відтермінованого антагонізму.
2. Визначити антагоністичну активність штамів лактобацил методом відстроченого антагонізму за методикою перпендикулярних штрихів.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення поняттю пробіотики.
2. Яким вимогам мають відповідати мікробні культури, які використовуються для конструювання пробіотиків?
3. Механізм дії пробіотичних препаратів та їх класифікація.
4. Що таке пребіотики та симбіотики?
5. Мікроорганізми яких груп можуть бути складовими пробіотиків?

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

Мета самостійної роботи: сформувати у студентів навички і вміння самостійної науково-аналітичної роботи, пов'язаної з пошуком нових перспективних підходів до розробки сучасних лікарських препаратів.

Самостійна робота по даній дисципліні виконується з метою закріплення і отримання знань, які отримуються при вивченні теоретичного матеріалу і виконанні лабораторних робіт. В результаті виконання самостійної роботи студенти повинні навчитись самостійно здійснювати пошук перспективних напрямів у розробці та модифікації лікарських препаратів, обґрунтовувати актуальність та

практичне значення знайденої інформації, проводити емпіричні дослідження, аналізувати і інтерпретувати отримані результати.

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО СКЛАД САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

Самостійна робота здійснюється методом індивідуального вивчення кожним студентом певних розділів робочої програми, навчальної програми з використанням рекомендованої літератури та консультаціями викладача. При засвоєнні лекційного матеріалу магістр користується навчальною літературою та навчально-методичними матеріалами, які рекомендує викладач. Для закріплення теоретичних знань магістри повинні виконати завдання, запропоновані у лабораторних роботах згідно з методичними вказівками.

САМОСТІЙНА РОБОТА ВИКОНУЄТЬСЯ ЗА ТАКИМИ РОЗДІЛАМИ:

1. Вивчення окремих теоретичних питань, які відповідають темам лекцій, але не входять до них:

Тема 1: Сучасні принципи класифікації антибіотиків.

Тема 2: Значення антибіотиків для життєдіяльності продуцентів.

Тема 3: Сучасні методи пошуку нових антибіотиків.

Тема 4: Експрес-методи швидкого визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів.

Тема 5: Клонування генів біосинтезу антибіотичних препаратів.

Тема 6: Антибіотики, що утворюються актиноміцетами. Антибіотики, які продукують гриби. Продуцент пеніциліну.

Тема 7: Сучасні методи виділення хімічної очистки антибіотиків.

Тема 8: Антибіотики – інгібітори синтезу нуклеїнових кислот (актиноміцини, мітоміцини, рифампіцин, налідіксова кислота). Пошук нових противірусних та протипухлинних препаратів.

Тема 9: Біохімічні механізми стійкості до лікарських препаратів.

Тема 10: Основні способи розробки фармацевтичних препаратів, їх переваги та недоліки. Технологія отримання пробіотичних та пребіотичних препаратів.

2. Підготовка кожним студентом доповіді-презентації то темам, які відповідають лекційному матеріалу, але не викладались на лекціях.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб./Л.М. Буценко, Ю.М.Пенчук, Т.П. Пирог — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
2. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» / Укладач: Головей О.П. – Кам’янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.
3. Мікробіологія: Підручник. / М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, А.І.Вінніков, Т.М. Фурзікова, Н.М. Жданова, І.В. Домбровська, Ю.В. Швець – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2005. – 375 с.

4. Мікробіологія з основами імунології. Підручник. 2-ге вид., перероб. І доп. / За ред. В.В. Данилейченка, Й.М. Федечка. – К.: Медицина, 2019. – 376 с.
5. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / Т.П. Пирог, Ю.М.Пенчук – К.: Видавництво Ліра-К, 2019. – 304 с.
6. Посохова К.А. Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія). Навч. посіб. / К.А. Посохова, О.П. Вікторов. – Тернопіль: ТДМУ, 2005. – 296 с.
7. Технологія ліків промислового виробництва: Підручник / В.І. Чуєшов, Л.М. Хохлова, О.О. Ляпунова та ін.: За ред. В.І. Чуєшова — Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — 720 с.
8. Лабораторний практикум із курсу «Антибіотики». / А.І. Вінніков, Л.П. Голодок, Т.В. Скляр, Н.П. Черногор. – Дніпропетровськ: РВВ ДНУ, 2007. – 22 с.
9. Internet мережа: www.ncbi.nlm.nih.gov, www.highwire.edu
10. Репозиторій ДНУ: <http://repository.dnu.dp.ua:1100>