

Лабораторна робота № 4

Тема: Визначення антагоністичної активності штамів

Мета роботи: дослідити антагоністичні відношення між різними групами мікроорганізмів. Дослідити антагоністичні властивості тест-культур.

Обладнання та матеріали: чисті культури мікроорганізмів-антагоністів – *Bacillus subtilis* та ін. Чисті культури бактерій в пробірках або чашках Петрі з МПА, бактеріологічні петлі, спиртівки, стерильні пробірки, предметні скла, чашки Петрі з МПА, термостат.

Теоретичні відомості

Для виявлення мікробів-антагоністів і вивчення їх антибіотичної активності існують різні методи. Багато з них засновані на здатності антибіотиків дифундувати в щільних середовищах.

1. Метод агарових блоків полягає в наступному: поверхня живильного середовища, придатного для розвитку випробуваного організму і утворення антибіотичної речовини, засівається суцільним «газоном» антагоніста.

Після того, як мікроорганізми утворюють колонії, у кінці експоненціальної фази почне утворюватись антибіотична речовина, яка дифундує в товщу агару (для бактерій - 4-5 діб, для грибів - 6-8 діб, для актиноміцетів - 8-10 діб). Після цього стерильним пробочним свердлом вирізають агарові блочки і переносять їх на поверхню іншої агарової пластинки в чашці Петрі, попередньо засіяної тест-організмом. Після інкубації в термостаті (час інкубації залежить від швидкості росту тест-культури) навколо агарових блоків утворюються зони відсутності росту тест-організму, якщо антибіотичну речовину, що виділяється досліджуваним організмом, пригнічує ріст тест-мікроорганізма.

За діаметром зон встановлюють антибіотичну активність досліджуваного мікроорганізму.

2. Метод паперових дисків

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків зручно визначати за допомогою готових паперових дисків, просочених певними антибіотиками. Концентрація антибіотиків у дисках підібрана з таким розрахунком, щоб діаметри зон затримки росту стандартних тест-організмів становили 28 - 32 мм.

1. Досліджувані мікроорганізми вирощують на відповідному щільному живильному середовищі.

2. Готують однорідну суспензію клітин у стерильній водопровідній воді. В 1 мл суспензії повинно міститися близько 2 млрд. клітин (визначають за стандартом мутності).

3. Вносять 1 мл суспензії в пробірку з 20 мл стерильного розплавленого і остиглого до 50°C агаризованого середовища, наприклад МПА. Якщо мікроорганізми вирощували в рідкому живильному середовищі, то в агар вносять відповідний обсяг культури.

4. Вміст пробірки швидко і ретельно перемішують і виливають у стерильну чашку Петрі. Коли середовище застигне, на його поверхню поміщають паперові диски на рівній відстані один від одного і на 1,5 - 2,0 см від краю чашки.

5. Чашки витримують 2 год. при кімнатній температурі для кращої дифузії антибіотиків у товщу агаризованого середовища, а потім 24 год. при 28 – 30°C.

6. Якщо досліджувані мікроорганізми чутливі до даних антибіотиків, то навколо дисків утворюються зони відсутності росту. Діаметр зони вимірюють міліметровою лінійкою.

Зона більше 30 мм свідчить про високу чутливість мікроорганізму до антибіотика, а менше 12 мм - про слабку чутливість.

3. При наявності розчинів антибіотичних речовин або культуральних рідин, що містять антибіотик, використовують **метод із застосуванням лунок в товщі агару**. У цьому випадку в застиглому агаризованому середовищі, засіяному випробуваним мікроорганізмом, стерильним пробочним свердлом (діаметр 6 - 8 мм) роблять лунки на відстані 1,5 - 2,0 см від краю чашки. В лунки вносять розчини антибіотиків або культуральну рідину. Цей метод дозволяє також виявити здатність до утворення антибіотичних речовин мікроорганізмами, вирощеними в рідкому середовищі.

ІНСТРУКЦІЯ

1. З агаризованого середовища з культурою актиноміцетів (або грибів) вирізати пробковим свердлом блок і перенести його (культурою догори) у центр іншої чашки Петрі з агаризованим середовищем;

2. Радіальними штрихами до агарового блоку (колонії-антагоніста) підсіяти суспензії тест-культур. Штрих починати від центру до периферії чашки.

3. Інкубувати посіви при температурі 37°C протягом 24 год. Через 24 год. виміряйте діаметр зони затримки росту культури навколо кожного диска з антибіотиком і визначте ступінь чутливості культури за наступними критеріями:

- а) діаметр зони затримки росту більше 25 мм - культура високочутлива;
- б) від 15 до 25 - чутлива;
- в) від 10 до 14 - малочутлива;
- г) менше 10 мм і повна відсутність - стійка.

4. Результати оформіть у вигляді таблиці.

Таблиця 1

Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів

Культура мікроорганізмів-антагоністів	Найменування або номер дослідної культури			
	1		2	
	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості

Контрольні питання:

1. Що таке антагонізм?
2. Назвіть мікроорганізми-продуценти антибіотиків.
3. Які методи застосовуються для визначення антагоністичної активності?
4. На які категорії поділяють взаємовідносини між мікроорганізмами?
5. Які групи взаємовідносин між мікроорганізмами відносять до сприятливих? Наведіть приклади.
6. Які групи співіснування мікроорганізмів виділяють у категорії «антагоністичні взаємовідносини»?
7. Де знайшло застосування явище мікробного антагонізму?