

## Лабораторна робота № 5

### Тема: Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків

**Мета роботи:** сформувати знання про антибіотики, їх класифікацію; ознайомитись з методами визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

**Матеріали, реактиви, обладнання:** чашки Петрі з МПА, бактеріологічна петля, пінцети, диски з антибіотиками; бульйонна культура *Staphylococcus aureus*, *E. coli*. та ін.

#### Питання для актуалізації знань

1. Які типи взаємовідносин між організмами Вам відомі?
2. У яких формах можуть проявлятися конкурентні взаємини у мікроорганізмів?
3. Що таке антибіотики?
4. Які існують механізми дії антибіотиків на бактеріальні клітини?

### Теоретичні відомості

**Антибіотики** (від грец. *anti* – проти, *bios* – життя) – це речовини біологічного походження, а також їх похідні синтетичні та півсинтетичні аналоги, які вибірково пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів. Термін „антибіотики” був запропонований мікробіологом С. Ваксманом у 1942 році. Цим терміном визначають високоактивні вторинні метаболіти мікробів, які здатні пригнічувати ріст інших мікроорганізмів. Антибіотики доводять існування антагоністичних відносин між мікроорганізмами.

**Антагонізмом** називаються такі взаємовідносини між мікробами, коли один вид не може розвиватися за присутності іншого.

Вперше явище антагонізму було відкрито Луї Пастером при культивуванні бацил сибірки і гнильних бактерій у 1887 р. Науково обґрунтував явище антагонізму видатний український вчений І.І. Мечников. Вивчаючи роль гнилісних бактерій кишечника в інтоксикації і старінні організму людини, він виявив антагоністичну дію до них молочнокислих бактерій. Для пригнічення розвитку гнилісної мікрофлори він запропонував вживати в їжу простоквашу, яка містить *Lactobacillus bulgaricus*. Пізніше було доведено антагоністичну дію *Bifidobacterium bifidum* і *E. coli* до збудників кишкових інфекцій.

Розрізняють **антагонізм пасивний і активний**.

**Пасивний антагонізм** виявляється у боротьбі мікробів за поживні речовини і повну адаптацію у відповідних екологічних нішах.

**Активний антагонізм** зумовлюється виділенням бактерицидних речовин (органічні кислоти, спирти, феноли тощо) у середовище. Причиною активного антагонізму серед мікробів може бути виділення деякими з них різних антибіотичних речовин, які вибірково діють на інші мікроорганізми.

Антибіотики належать до вторинних метаболітів. Їх біосинтез не зв'язаний з ростом мікроорганізмів і вони не є життєво необхідними. Вони утворюються лише при певних умовах для забезпечення їх продуцентів в умовах конкуренції. Деякі з них можуть виконувати низку фізіологічних функцій в організмі.

**Продуцентами антибіотиків є:**

- *бактерії* (граміцидин, бацитрацин, едеїн, тиротрицин, субтилін),
- *актиноміцети* (стрептоміцин, тетрациклін, мономіцин, левоміцетин, ністатин);
- *гриби* (пеніцилін, цефалоспорини, грізофульвін, мікроцид, фумагілін).

Із міцеліальних грибів особливу увагу потрібно звернути на плісеньові гриби, які є продуцентами так званих *бета-лактамних антибіотиків*: пеніцилінів і цефалоспоринів. Найбільш активними продуцентами антибіотиків є актиноміцети роду *Streptomyces* (тетрациклін).

**Антибіотики класифікуються** за трьома основними ознаками: за *спектром і спрямованістю біологічної дії*, за *хімічною структурою* та за *молекулярним механізмом дії на мікробну клітину*.

**За спектром дії** розрізняють антибіотики *вузького і широкого спектра*.

– *антибіотики вузького спектру дії* пригнічують ріст певної групи мікроорганізмів (бензилпеніцилін, еритроміцин, грізеофульвін новобіцин), активні переважно до грампозитивних мікроорганізмів;

– *антибіотики широкого спектру дії* (цефалоспорини, тетрацикліни, трихотетин) пригнічують ріст і розмноження грампозитивних і грамнегативних форм бактерій.

**За ефектом протимікробної дії** антибіотики поділяють на:

– *бактерицидні*, що спричиняють загибель певних видів мікроорганізмів;

– *бактеріостатичні*, що пригнічують ріст і розмноження мікроорганізмів, але не знищують їх.

**За спрямованістю дії** антибіотики поділяють на чотири основні групи:

– *антибактеріальні* (більшість відомих антибіотиків);

– *протигрибкові* (ністатин, леворин);

– *протівірусні* (інтерферон, інтерлейкіни);

– *протиухлинні* (рубоміцин, актиноміцин).

**За молекулярним механізмом дії** антибіотики поділяють на групи залежно від мішені в бактеріальній клітині:

– порушують синтез клітинної стінки бактерій (пеніциліни, ристоміцин, новобіоміцин). Порушуючи синтез пептидоглікану вони сприяють перетворенню нормальної бактеріальної клітини в L-форму.

– порушують синтез білків на рівні 70S рибосом (тетрацикліни, макроліди, левоміцетин);

– пригнічують синтез білків у бактеріальній клітині і порушують трансляцію генетичного коду (аміноглікозиди);

– пригнічують синтез нуклеїнових кислот, трансляцію і реплікацію ДНК (актиноміцини, міаміцин);

– порушують цілісність цитоплазматичної мембрани бактерій (поліміксини), протигрибкові (ністатин);

– пригнічують окисно-відновні ферменти у мікобактерій (стрептоміцин), активність декарбоксилази стрептококів, найпростіших, колі-бактерій (хлортетрациклін).

У теперішній час багато антибіотиків отримують промисловим способом. Відомо понад 2000 антибіотиків, але враховуючи високу токсичність більшості з них для людини, використовують лише близько 50.

## ІНСТРУКЦІЯ

### Завдання 1. Визначити чутливість мікроорганізмів до антибіотиків

Для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків широко використовують метод дифузії антибіотиків у агар із спеціально зроблених паперових дисків. На одній чашці Петрі можна одночасно визначати цим методом чутливість бактерій до багатьох антибіотиків. Для цього на стерильне поживне середовище в чашки Петрі висівають чисту культуру, яка буде слугувати тест-організмом. Сутність цього методу полягає в тому, що диски просочують досліджуваним розчином і розкладають на поверхню агаризованого середовища. Антибіотики, якими просочені диски, дифундують у поживне середовище. Якщо на його поверхні засіяно чутливий мікроб, то навколо диска з'являється зона пригнічення росту бактерій. Величина такої зони визначає ступінь чутливості бактерій до того або іншого антибіотика. Чим більш чутливим виявляється до

антибіотика мікроб, тим більшим буде діаметр зони пригнічення росту (рис. 9.1).

### Порядок виконання роботи

1. Суспензію чистої культури *Staphylococcus aureus* (або іншої культури) наносять на поверхню МПА за допомогою піпетки.
2. Розтирають скляним шпателем по поверхні агарової пластинки (метод посіву газоном).
3. Чашку залишають на 15-20 хвилин при кімнатній температурі.
4. Потім на поверхню агару стерильним пінцетом розкладають на однаковій відстані один від одного паперові диски, просочені різними антибіотиками. Серед антибіотиків такі: пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін, левоміцетин та інші
5. Чашки позначають і ставлять для культивування до термостату за температури 37° С на 2-3 доби.
6. **На наступному занятті** чашки перевіряють, за допомогою лінійки заміряють діаметр зони пригнічення росту культури навколо дисків з антибіотиками.
7. За величиною цих зон роблять висновок про чутливість штаму, що тестується, до кожного з застосовуваних антибіотиків (антибіотикограма).

Результати вимірювань занести до таблиці 9.1 і проаналізувати.

Граничні значення діаметрів зон пригнічення росту для інтерпретації результатів наведені у Додатку.

Таблиця 1

### Чутливість бактерійних культур до антибіотиків

Антибіотики	Величина зони затримки росту бактерій, мм			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> K-12	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Бензпеніцилін (1)	-	-	-	30
Стрептоміцин (2)	28	24	40	36
Еритроміцин (3)	9	12	-	30
Тетрациклін (4)	35	36	9	36
Левоміцетин (5)	33	36	28	35
Ристоміцин (6)	12	13	-	27

**Зробити висновки** щодо чутливості досліджуваних бактеріальних культур до певних антибіотиків.

**Завдання 2. Наведіть класифікацію антибіотиків. Заповніть таблицю 2.**

*Таблиця 2*

**Класифікація антибіотиків**

Назва групи	Характеристика	Приклад
<b>За походженням</b>		
Природні		
Напівсинтетичні		
Синтетичні		
<b>За типом продуцента</b>		
Антибіотики, що синтезуються грибами		
Антибіотики, що синтезуються бактеріями		
Фітонциди		
<b>За характером дії препарату</b>		
Бактерицидні		
Бактеріостатичні		

**? Питання для самоконтролю:**

1. Які методи дослідження антагоністичної активності мікроорганізмів Ви застосували?
2. Що таке бактерицидна дія і бактеріостатичний ефект?
3. Що таке фунгіцидна дія і фунгіцидний ефект?
4. У чому полягає суть методу паперових дисків?
5. До антибіотиків якого спектру дії належать пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін, левоміцетин?
6. Які організми використовують у якості тест-культури?

## ДОДАТОК

Граничні значення діаметрів зон затримки росту для інтерпретації результатів

Антибіотики	Код диску	Діаметр зони, мм		
		стійкі	помірно стійкі	чутливі
Бензпеніцилін (для стафілококів)	ПЕН	< 20	21-28	>29
Бензпеніцилін (для інших мікроорганізмів)	ПЕН	< 11	12-21	>22
Стрептоміцин	СТР	< 13	14-16	> 17
Неоміцин	НЕО	< 13	14-17	> 18
Тетрациклін	ТЕТ	< 15	16-19	> 20
Еритроміцин	ЕРИ	< 14	15-18	> 19
Левоміцетин	ЛЕВ	< 14	15-18	> 19
Ристоміцин	РИС	< 9	10-11	> 12