

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

БІОТЕХНОЛОГІЯ АНТИБІОТИКІВ: ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

*Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для студентів,
які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»,
освітньою програмою «Біотехнології»*

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2020

Біотехнологія антибіотиків: Лабораторний практикум [Текст] : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітня програма «Біотехнології» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, В. Ю. Поліщук. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 40 с.

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського (протокол № 10 від 18.06.2020р.)
за поданням Вченої ради факультету біотехнології і біотехніки (протокол № 10 від
25.05.2020 р.)*

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ АНТИБІОТИКІВ: ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

Укладачі: *Орябінська Лариса Борисівна*, канд. біол. наук, доц.
Дзигун Лариса Петрівна
Поліщук Валентина Юрївна, канд. техн. наук

Відповідальний редактор *Тодосійчук Т.С.*, д-р техн. наук, доцент

Рецензент *Черненко В.Ю.*, канд. мед. наук, доцент, доцент кафедри фізичної хімії КПІ ім. Ігоря Сікорського

Метою дисципліни є формування у студентів здатності до аналізу та вирішення задач в галузі багатопланової науки про антибіотики. Ознайомити студентів з технологією виробництва антибіотиків та застосування їх в медицині та інших галузях народного господарства. У лабораторному практикумі наведені стандартні методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, що рекомендовані МОЗ України для застосування в мікробіологічних лабораторіях установ охорони здоров'я; наведені методи виділення та ідентифікації актиноміцетів, продуцентів антибіотичних речовин.

Лабораторний практикум «Біотехнологія антибіотиків» рекомендовано для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020

ЗМІСТ

Правила роботи та техніки безпеки в лабораторії.....	4
Лабораторна робота № 1 Дифузійні методи дослідження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.....	5
Лабораторна робота № 2 Дослідження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків методом серійних розведень в рідкому поживному середовищі.....	11
Лабораторна робота №3 Проведення якісних реакцій на антибіотики....	16
Лабораторна робота № 4 Виділення актиноміцетів – продуцентів антибіотичних речовин та визначення їх антимікробного спектру.....	20
Лабораторна робота № 5 Біосинтез антибіотичних речовин в умовах поверхневого та глибинного культивування.....	27
Лабораторна робота № 6 Ідентифікація актиноміцетів.....	32
Список літератури.....	38
Додаток 1 Схема опису актиноміцету.....	39

ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ В ЛАБОРАТОРІЇ

1. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі та класти на столи сумки, портфелі та інші особисті речі.
2. У мікробіологічній лабораторії дозволяється працювати тільки у халатах, які захищають одяг від забруднення мікроорганізмами, а також перешкоджають розповсюдженню їх за межі лабораторії.
3. За кожним студентом закріплюють постійне робоче місце і мікроскоп. Робоче місце під час занять повинно утримуватися у цілковитому порядку.
4. На всіх пробірках та чашках обов'язково пишуть назву мікроорганізму, дату його посіву, прізвище, ім'я та по батькові студента, номер групи.
5. У ході роботи бактеріологічні петлі та голки знезаражуються прожарюванням у полум'ї горілки. Використані шпатели, предметні та покривні скельця, піпетки вміщують у банки з дезінфікуючим розчином. Класти на стіл названі предмети категорично забороняється.
6. У випадку попадання досліджуваного матеріалу або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат або взуття необхідно негайно повідомити про це викладача та під його керівництвом провести дезінфекцію.
7. У лабораторії категорично забороняється вживати їжу. Не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів).
8. Після закінчення дослідження (заняття) робоче місце дезінфікується, використаний матеріал та інші предмети здаються лаборантові, миються з милом руки.
9. Результати дослідження обов'язково протоколюються. У протоколі записується тема заняття, поставлена задача та короткий опис ходу роботи. При мікроскопічному дослідженні препаратів мікроорганізмів результати заносять у протокол у вигляді малюнка з повною назвою об'єкта латинською мовою. Робиться загальний висновок по результатах дослідження.
10. На кожне заняття в групі назначають чергових. Під час роботи вони слідкують за виконанням кожним студентом правил роботи та поведінки в лабораторії. Після закінчення заняття чергові здають відпрацьований матеріал на стерилізацію, вимикають газові крани, світло та провітрюють приміщення.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

ДИФУЗІЙНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБІОТИКІВ

Антибіотики – це специфічні продукти життєдіяльності організмів, а також їх похідні та синтетичні аналоги, що проявляють високу фізіологічну активність та вибірковість дії по відношенню до мікроорганізмів, вірусів і клітин злоякісних пухлин. Головною характеристикою антибіотиків (АБ) є їх активність щодо патогенів різного походження. Кожен антибіотик має свій спектр антимікробної дії. Під **спектром дії** розуміють сукупність мікроорганізмів, на які діють антибіотики. За спектром дії антибіотики поділяють на п'ять груп залежно від того, на які об'єкти вони чинять вплив.

1 група – **антибактеріальні антибіотики**, становлять найчисленнішу групу препаратів. Вони поділяються на антибіотики **вужького спектру дії**, які активні щодо тільки Γ^+ мікроорганізмів або, в рідкісних випадках, щодо Γ^- мікроорганізмів, і антибіотики **широкого спектру дії**, які активні щодо як Γ^+ , так і Γ^- мікроорганізмів.

2 група представлена **протитуберкульозними препаратами**.

3 група включає **протигрибкові антибіотики**.

4 група – **антипротозойні антибіотики**.

5 група – **протиракові антибіотики**, які представлені препаратами, що проявляють цитотоксичну дію.

У клінічній практиці антибактеріальні препарати призначають виходячи зі спектру їх дії. Однак, при неефективності антибактеріальної терапії або складності визначення природи збудника здійснюють виділення патогену з осередку ураження з наступним визначенням його чутливості до антибіотиків різного класу і механізму дії.

Сучасні стандартизовані методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків поділяють на **дифузійні методи** і **методи серійних розведень**.

Дифузійні методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків ґрунтуються на здатності АБ дифундувати з просочених ними паперових дисків або пластин в поживне середовище, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, посіяних на поверхні агару.

На даний час існують дві основні модифікації дифузійного методу: диско-дифузійний та Е-тест.

У **диско-дифузійному методі** в якості носія АБ використовують паперові диски. У певних межах величина діаметра зони пригнічення росту обернено пропорційна мінімальній пригнічуючій концентрації (МПК) (рис. 1). Однак, диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано зробити висновок про

величину МПК, а результатом дослідження є віднесення мікроорганізму до однієї з категорій чутливості (чутливий, помірно-чутливий або резистентний).

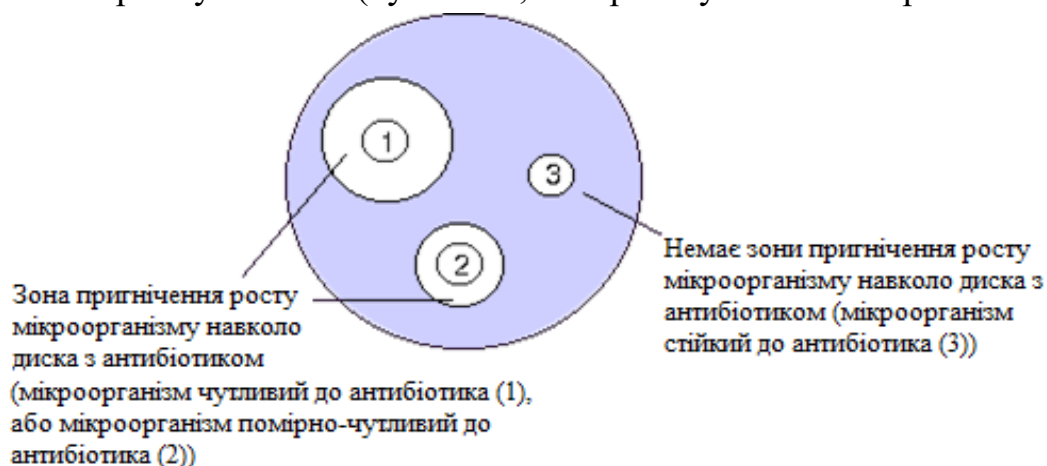


Рис. 1. Інтерпретація результатів при використанні диско-дифузійного методу (<http://www.antibiotic.ru/rus/all/articles/absens.shtml>)

Е-тест. Визначення чутливості мікроорганізму за допомогою Е-тесту проводиться аналогічно тестуванню диско-дифузійним методом. Відмінність полягає в тому, що замість диска з антибіотиком використовують смужку Е-тесту, що являє собою вузьку смужку полімеру (0,5×6,0 см), яка містить градієнт концентрацій антибіотика від максимальної до мінімальної. 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.



Рис. 2. Визначення чутливості мікроорганізмів за допомогою Е-тесту (<http://www.antibiotic.ru/rus/all/articles/absens.shtml>)

Безсумнівною перевагою дифузійних методів є простота тестування і доступність виконання. Однак, з урахуванням високої вартості Е-тестів для рутинної роботи зазвичай використовують диско-дифузійний метод.

ЗАВДАННЯ:

1. Приготувати посівний матеріал тест-культури.
2. Визначити чутливість тест-культури до антибіотиків методом паперових дисків.

ХІД РОБОТИ

Робота з дослідження чутливості мікроорганізмів до АБ диско-дифузійним методом включає наступні етапи:

- приготування та розлив поживних середовищ;
- приготування суспензії досліджуваної тест-культури (інокулюму);
- інокуляція;
- накладання дисків або смужок Е-тесту на засіяне щільне поживне середовище;
- інкубація;
- облік та інтерпретація результатів.

Приготування та розлив поживних середовищ

Метод потребує використання стандартних поживних середовищ на основі агар-агару фірми «Діфко» або «Тафуїнський».

Використовують стерильне агаризоване поживне середовище на основі бульйону на переварі Хоттінгера (з вмістом 120-140 мг% амінного азоту) наступного складу (на 1000 мл бульйону): агар-агар «тафуївський» – 15 г, натрію фосфат двозаміщений – 3 г; рН середовища після стерилізації – 7,0-7,2.

Середовище розплавляють на водяній бані. Перед заповненням розплавленим середовищем чашки Петрі встановлюють на горизонтальну поверхню, вивірену за рівнем. Це необхідно, оскільки розмір і форма зони пригнічення росту залежать від глибини і рівномірності агарового шару. Товщина шару в чашці Петрі повинна становити $(4,0 \pm 0,5)$ мм, що досягається шляхом внесення в чашку діаметром 90 мм 20 мл агару (для чашки діаметром 100 мм – 25 мл агару).

Після заповнення чашки залишають при кімнатній температурі для застигання. Зберігати чашки можна запаяними в поліетиленові пакети при 4-8 °С протягом 7-10 діб.

Приготування суспензії досліджуваної тест-культури (інокулюму)

Як інокулюм використовують суспензію добової тест-культури з концентрацією 10^8 КУО / мл.

Для її приготування петлею переносять незначну кількість добової культури, що виросла на щільному поживному середовищі, в пробірку зі стерильним бульйоном або фізіологічним розчином. Порівнюють каламутність

приготованої суспензії та стандарту каламутності 0,5 за МакФарландом, що відповідає концентрації 10^8 КУО / мл, помістивши пробірки на білому тлі з контрастними горизонтальними чорними лініями. Перед використанням стандарт МакФарланда ретельно струшують.

NB! Інокулюм необхідно використати протягом 15 хвилин після приготування.

Інокуляція

Інокуляцію можна здійснити двома способами:

– Найбільш зручним способом інокуляції є використання стерильних ватних тампонів. Тампон занурюють у стандартну суспензію мікроорганізму, потім надлишок інокулюму видаляють, віджавши тампон об стінки пробірки. Інокуляцію проводять штриховими рухами в трьох напрямках, повертаючи після кожного нанесення чашку Петрі на 60° .

– При використанні другого способу стандартний інокулюм наносять піпеткою на поверхню чашки Петрі з поживним середовищем в об'ємі 1-2 мл, рівномірно розподіляють по поверхні похитуванням, після чого видаляють надлишок інокулюму піпеткою.

Чашки підсушують при кімнатній температурі протягом 10 хв для видалення вологи з поверхні середовища.

Накладання дисків на щільне засіяне поживне середовище

Не пізніше, ніж через 15 хв. після інокуляції, на поверхню поживного середовища наносять диски з АБ. Аплікацію дисків проводять за допомогою стерильного пінцета. Відстань від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15-20 мм. На одну чашку діаметром 100 мм слід поміщати не більше 6 дисків з АБ. Для рівномірного контакту дисків з поверхнею агару їх слід акуратно притиснути пінцетом.

На етикетці упаковки дисків, що випускаються промисловістю, зазначені вміст антибіотика в диску (мкг або ОД), терміни і температура зберігання.

Інкубація

Після аплікації дисків чашки Петрі негайно поміщають у термостат догори дном та інкубують при температурі $35-37^\circ\text{C}$ протягом 18-24 год (залежно від виду досліджуваного мікроорганізму). Для запобігання отримання хибних результатів, чашки Петрі з дисками необхідно негайно помістити в термостат, оскільки збільшення інтервалу часу між нанесенням дисків на поверхню середовища і початком інкубації, а отже – і початком росту досліджуваної культури мікроорганізму, призводить до «предифузії» АБ в

агар та збільшенню діаметру зони пригнічення росту.

Облік та інтерпретація результатів

Після закінчення інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45 ° (перегляд у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту вимірюють з точністю до 1 мм.

При вимірюванні зон затримки росту орієнтуються на **зону повного пригнічення видимого росту**. Не звертають увагу на дуже дрібні колонії, які виявляються в межах зони затримки росту тільки при особливих умовах освітлення або збільшенні, а також ледь помітний наліт біля краю зони.

Великі колонії, які виявляються в межах чіткої зони пригнічення росту, свідчать про наявність сторонньої мікрофлори або про гетерорезистентність популяції мікроорганізмів.

Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводять відповідно до величин зон затримки росту, представлених в таблиці 1.

Мікроорганізми за ступенем чутливості до антибіотиків поділяють на групи:

1 група – чутливі до антибіотиків (збудники знищуються в організмі при використанні звичайних терапевтичних доз препаратів);

2 група – помірно-резистентні / помірно чутливі (для них лікувальний ефект може бути досягнутий при використанні максимальних терапевтичних доз препаратів);

3 група – резистентні (бактерицидних концентрацій препаратів в організмі досягти неможливо, оскільки вони будуть токсичними).

Отримані дані вносять до таблиці 2 та роблять висновки щодо чутливості досліджуваного мікроорганізму.

Таблиця 1. Чутливість штамів за діаметром затримки росту мікроорганізму

№	Антибіотик	Вміст антибіотика в диску, мкг	Діаметр зони затримки росту, мм		
			Стойкі штами	Помірно чутливі	Чутливі штами
Пеніциліни					
1	Ампіцилін	10	≤ 11	12-21	≥ 22
2	Оксацилін	10	≤ 10	11-12	≥ 13
3	Бензилпеніцилін	10	≤ 11	12-21	≥ 22
Аміноглікозиди					
4	Гентаміцин	10	≤ 13	-	≥ 14
5	Стрептоміцин	30	≤ 13	14-16	≥ 17

Продовження таблиці 1.

6	Неоміцин	30	≤ 12	13-16	≥ 17
7	Канаміцин	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Макроліди					
8	Еритроміцин	15	≤ 17	18-21	≥ 22
9	Лінкоміцин	15	≤ 19	20-23	≥ 24
Тетрацикліни					
10	Тетрациклін	30	≤ 16	17-22	≥ 23
Ряд фторхінолові					
11	Офлоксацин	5	≤ 12	13-16	≥ 17
12	Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16-20	≥ 21
13	Енрофлоксацин	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Цефалоспорины					
14	Цефазолін	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Поліміксини					
15	Поліміксин С (М)	300 ОД	≤ 11	12-14	≥ 15
16	Поліміксин М	300 ОД	≤ 11	12-14	≥ 15
Левоміцетин					
17	Левоміцетин	30	30	≤ 15	16-19

Таблиця 2. Чутливість досліджуваного мікроорганізму _____ до антибіотиків за діаметром затримки його росту

№	Антибіотик	Вміст антибіотика в диску, мкг	Діаметр зони затримки росту, мм	Чутливі штами, Помірно чутливі або Стіькі штами
1				
2				
...				

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Дайте сучасне визначення антибіотиків.
2. Охарактеризуйте загальні властивості антибіотиків.
3. У якому випадку антимікробні речовини, отримані хімічним синтезом, будуть відноситися до групи антибіотиків.
4. Що розуміють під спектром дії антибіотиків.
5. Класифікація антибіотиків за спектром дії.
6. Якими методами визначають чутливість мікроорганізмів до антибіотиків.
7. Як поділяють мікроорганізми за ступенями їх чутливості до антибіотиків.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБІОТИКІВ МЕТОДОМ СЕРІЙНИХ РОЗВЕДЕНЬ В РІДКОМУ ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Метод послідовних розведень антибіотика в поживному середовищі в стандартних умовах досліду є більш надійним і точним кількісним методом визначення активності антибіотика. Суть методу полягає у вирощуванні мікроорганізмів в присутності різних концентрацій антибіотика, при яких відзначається наявність або відсутність їх видимого росту. Метод дозволяє визначити мінімальну пригнічуючу концентрацію антибіотика (МПК), яка є основним кількісним показником, що характеризує його мікробіологічну активність. МПК виражається в мкг / мл або в ум.од / мл. Чим менше МПК, тим активніший антибіотик. Метод також дає можливість визначити мінімальну концентрацію антибіотика, що пригнічує ріст збудника інфекції (бактеріостатична дія) або викликає його загибель (бактерицидна дія). Залежно від характеру поживного середовища, що використовується, розрізняють методи серійних розведень в агарі або в бульйоні.

ЗАВДАННЯ:

1. Визначити МПК досліджуваного антибіотика методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі.
2. Визначити значення бактерицидної та бактеріостатичної концентрації антибіотику.

ЕТАПИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

- приготування та розлив поживних середовищ;
- приготування розчинів антибіотиків;
- внесення антибіотика в середовище методом серійних розведень;
- приготування суспензії досліджуваних мікроорганізмів (інокулюму);
- інокуляція середовища тест-культурою;
- інкубація;
- облік та інтерпретація результатів.

ХІД РОБОТИ

Приготування та розлив поживних середовищ

Найбільш придатними середовищами для визначення чутливості до антибіотиків більшості патогенних мікроорганізмів є бульйон на переварі Хоттінгера, що містить 110-130 мг амінного азоту (для приготування щільних

поживних середовищ додають 1,5-2 % агару). Може бути використаний звичайний м'ясо-пептонний бульйон (з 1,5-2 % агару для щільних середовищ). Проте, м'ясо-пептонні середовища менш стандартні, ніж середовище на переварі Хоттінгера.

Істотний вплив на результати дослідження має рН середовища. Найбільш доцільно обирати нейтральне рН або злегка лужне (7,0-7,4). Ці значення рН придатні для більшості антибіотиків.

При виборі середовища також необхідно враховувати потреби мікроорганізмів у поживних речовинах. Зокрема, при визначенні чутливості стрептококів до антибіотиків до середовища додають глюкозу в кінцевій концентрації 1%. При визначенні чутливості патогенних грибів використовують середовище Сабуро, коклюшної палички – середовище Борде-Жангу або казеїново-вугільний агар.

При постановці лабораторної роботи використовують МПБ, який з дотриманням правил асептики розливають в кількості 1 мл в 13 стерильних пробірок, розміщених в штативі.

Приготування розчинів антибіотиків

Для підготовки розчинів антибіотиків використовують стандарти антибіотиків, де на етикетці кожного флакону зазначено число одиниць або мікрограмів, що містяться в 1 мг препарату, а також термін придатності. Всі антибіотики гігроскопічні, тому зберігати відкриті флакони слід щільно закупореними в ексікаторі при температурі 4 °С.

У зв'язку з тим, що АБ істотно відрізняються за розчинністю, для їх солюбілізації (розчинення) використовують розчинники, а для доведення до заданої концентрації – розбавлювачі. Дані про системи розчинника і розбавлювача антибіотиків представлені в таблиці 3.

Таблиця 3. Розчинники і розбавлювачі для окремих антибіотиків

Антибіотик	Розчинник, мл (на 1мг антибіотика)	Розбавлювач, мл
Пеніцилін, стрептоміцин, поліміксин	Дистильована вода	
Тетрацикліни	0,01 н розчин хлористоводневої кислоти	
Хлорамфеникол (левоміцетин)	95%-й етанол з розрахунку 1 мг левоміцетину на 0,3 мл спирту	Вода
Еритроміцин	чистий метиловий або етиловий спирт з розрахунку 10 мг еритроміцину в 1 мл спирту	Вода

Продовження таблиці 3.

Канаміцин, гентаміцин	0,1 М фосфатний буфер рН 8,0	
Рифампіцин – диметилформамід або рифампіцин – диметилсульфоксиду	0,1 М фосфатний буфер рН 6,0	
Ампіцилін	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Амоксицилін	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Азитроміцин	95%-й етанол або крижана оцтова кислота	Поживне середовище
Азтреонам	Натрію бікарбонат насичений розчин	Вода
Цефазолін	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Цефалотин	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Вода
Цефуроксим	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Вода
Цефтазидим	Натрію карбонат	Вода
Цефепим	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Іміпенем	Фосфатний буфер 0,01 моль/л рН 7,2	Фосфатний буфер 0,01 моль/л рН 7,2
Азитроміцин	95%-й етанол або крижана оцтова кислота	Поживне середовище
Кларитроміцин	95%-й етанол або крижана оцтова кислота	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 6,5
Налідиксова кислота Еноксацин Норфлуксацин Офлуксацин	1/2 об'єму води, потім додають по краплях 0,1 моль/л розчин NaOH до розчинення	Вода
Нітрофурантоїн	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатний буфер 0,1 моль/л рН 8,0
Рифампін	Метанол	Вода
Сульфаніламід	1/2 об'єму гарячої води і мінімальна кількість 2,5 моль/л розчину NaOH	Вода
Триметоприм	0,05 N розчин соляної кислоти до 10% від кінцевого об'єму	Вода

В умовах асептики студенти готують 5-10 мл базового розчину АБ в концентрації 1000 мкг/мл, використовуючи дані табл. 3.

З базового розчину АБ шляхом розведення у 2 рази в МПБ готують робоче розведення з концентрацією 500 мкг/мл. Дане розведення у більшості випадків є достатньою верхньою межею для проведення досліджень із будь-якою антимікробною сполукою.

При необхідності базові розчини можуть зберігатися в холодильнику. Розчини стрептоміцину, дигідрострептоміцину, левоміцетину, канаміцину зберігають активність 30 днів; пеніциліну – 3 дні, інших антибіотиків – протягом 1 тижня. При зберіганні за температури -60°C основні розчини антибіотиків (1000 мкг/мл) не втрачають активності протягом 6 місяців і більше.

Внесення антибіотика в середовище методом серійних розведень

Робочий розчин антибіотика з концентрацією 500 мкг/мл методом серійного двократного розведення розводять в попередньо підготовлених пробірках з 1 мл МПБ. Для цього робочий розчин антибіотика вносять у кількості 1 мл в першу пробірку, що містить 1 мл МПБ. Вміст пробірки ретельно перемішують і новою стерильною піпеткою переносять з неї 1 мл суміші до наступної пробірки.

Розведення продовжують до передостанньої (10 пробірки), з якої видаляють 1 мл суміші. 11 та 12 пробірки, що не містять антибіотику, слугують контролем росту культури та «негативним контролем».

Приготування робочої суспензії клітин тест-культури (інокулюму)

В якості робочої суспензії клітин тест-культури використовують суспензію, що приготована на МПБ і містить 10^6 КУО / мл.

Приготування робочої суспензії здійснюють в 2 етапи:

- На першому етапі на основі МПБ, використовуючи схему, описану в лабораторній роботі 1, готують **стандартну** суспензію клітин з концентрацією 10^8 КУО / мл за стандартом 0,5 МакФарланда.
- Робочу суспензію клітин з концентрацією 10^6 КУО / мл готують на МПБ шляхом розведення стандартної суспензії в 100 разів. Для цього до 19,8 мл стерильного МПБ у цукровій пробірці додають 0,2 мл стандартного розчину (10^8 КУО / мл).

Інокуляція.

До кожної пробірки, що містить різні концентрації антибіотика, а також в контрольні пробірки, додають 1 мл робочої суспензії клітин з концентрацією 10^6 КУО / мл.

Інкубація

Пробірки інкубують у термостаті при 37 °С протягом 18-24 годин, крім пробірки з «негативним контролем», яка поміщається в холодильник при 4 °С до обліку результатів.

Облік та інтерпретація результатів

Результати аналізують, визначаючи наявність (+) або відсутність (-) росту в середовищах з різними розведеннями препарату. Ріст культури у присутності АБ порівнюється з «негативним контролем», що містить початковий інокулюм, який зберігався у холодильнику. Остання пробірка, в якій спостерігають затримку росту культури (прозорий бульйон), відповідає МПК.

Результати досліджень заносять за прикладом в таблицю 4.

Визначення бактерицидної або бактеріостатичної концентрації

Для визначення мінімальної бактерицидної (МБцК) або мінімальної бактеріостатичної концентрації (МБсК) з 2-3 останніх пробірок, в яких відсутній видимий ріст, роблять посів петлею на агар або бульйон. Через 24-48 год інкубації в термостаті відзначають ту найменшу концентрацію антибіотика в пробірці, посів з якої не дав росту, і приймають її за МБцК.

Бактеріостатичною вважають мінімальну пригнічуючу концентрацію, при якій на середовищі спостерігається ріст. Результати заносять в таблицю 4 і оформлюють протокол.

Таблиця 4. Визначення МПК антибіотику _____
по відношенню до культури _____

Пригнічуючі концентрації	Концентрація антибіотика А, мкг/мл										Контроль
	125,0	62,5	31,25	15,625	7,813	3,9	1,95	0,976	0,488	0,244	
МПК	-	-	-	-	-	/-/	+	+	+	+	+
МБсК				-	-	/+/					
МБцК				-	/-/						

У висновку вказують значення МПК відповідного антибіотика, а також МБсК та МБцК.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Проаналізуйте значення антибіотиків для продуцентів.
2. Якими методами визначають чутливість мікроорганізмів до антибіотиків.
3. Дайте поняття МПК, МБсК і МБцК антибіотика. В яких одиницях вони виражаються
4. Як корелює активність антибіотика і величина МПК
5. Яким чином антибіотики класифікуються за біологічним походженням.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

ПРОВЕДЕННЯ ЯКІСНИХ РЕАКЦІЙ НА АНТИБІОТИКИ

Одним із завдань, яке стоїть перед дослідником при розробці препаратів антибіотиків, є встановлення їх хімічної природи. Хімічна природа визначає активність і спектр дії препарату, розчинність в біологічних рідинах, швидкість виведення з організму і т. д.

Антибіотики можуть належати до різних класів хімічних сполук.

Найбільш широко в медицині використовуються антибіотики, які відносяться до групи азотовмісних гетероциклічних сполук, молекули яких містять різноманітні кільцеві структури. Серед цієї групи найбільший практичний інтерес представляють **β -лактамі** антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини), що містять β -лактамне кільце. Антибіотики цієї групи представлені як природними, так і напівсинтетичними препаратами, що володіють високою клінічною ефективністю і низькою токсичністю. Механізм дії β -лактамічних антибіотиків спрямований на порушення синтезу клітинної стінки бактерій.

Група **тетрациклінових антибіотиків** включає як природні, так і напівсинтетичні препарати. Тетрацикліни є антибіотиками широкого спектру дії. У високих концентраціях діють на деяких найпростіших. У концентраціях, що зазвичай застосовуються, тетрацикліни діють бактеріостатично. Механізм дії тетрацикліну спрямований на пригнічення синтезу білка в мікробних клітинах.

Антибіотики **макроліди** – група антибіотиків, основою хімічної структури яких є макроциклічне 14- або 16-членне лактонне кільце, до якого приєднані один або кілька вуглеводних залишків. Макроліди відносяться до малотоксичних антибіотиків широкого спектру дії. Чинять переважно бактеріостатичну дію, у високих концентраціях – бактерицидну. Механізм дії пов'язаний з пригніченням синтезу білка в клітинах чутливих мікроорганізмів. Природними макролідами є еритроміцин і олеандоміцин.

Левоміцетин – антибіотик широкого спектру дії. Механізм антимікробної дії пов'язаний з порушенням синтезу білків. Досить токсичний і часто залишає важкі побічні ефекти при застосуванні внутрішньо.

Аміноглікозиди за хімічною будовою являють собою сполуки, що включають аміноцукор, з'єднаний глікозидним зв'язком з аміноциклічним кільцем. Аміноглікозиди є бактерицидними антибіотиками, механізм дії яких спрямований на пригнічення синтезу білка. До аміноглікозидних антибіотиків відносяться: стрептоміцин, канаміцин, гентаміцин і ряд інших антибіотиків.

Лінкозаміди – група антибіотиків, до якої належить природний антибіотик лінкоміцин і його напівсинтетичний аналог кліндаміцин. Антибіотики активні переважно по відношенню до аеробних грампозитивних бактерій і мікоплазм. За механізмом дії відносяться до інгібіторів синтезу білка. У терапевтичних дозах діють бактеріостатично.

Полієнові антибіотики містять у своїй структурі спряжені подвійні зв'язки. До цієї групи належать в основному протигрибкові препарати, серед яких в медичній практиці найбільш широко використовується ністатин. Антибіотик проявляє високу тропність до стеролових структур клітинної мембрани грибів. Вбудовування молекули ністатину в мембрану клітини викликає утворення каналів, які порушують транспорт електролітів. Загибель клітини, як правило, зумовлюється порушенням концентрації розчинених в ній речовин. Резистентність до антибіотика розвивається дуже повільно.

Одними зі швидких якісних методів визначення природи антибіотиків є хімічні методи, які дозволяють провести аналіз приналежності препаратів до певних груп хімічних речовин.

ЗАВДАННЯ

1. Провести якісні реакції для виданого зразка препарату.
2. Визначити за характером протікання хімічних реакцій приналежність досліджуваної речовини до групи антибіотиків та інших антимікробних хімічних сполук.
3. Порівняти отримані дані з даними для еталонного хіміотерапевтичного препарату з тієї ж групи.

ХІД РОБОТИ

Еритроміцин

- До 0,1 г (або 0,1 мл розчину) додають 0,5 мл ацетону і 0,5 мл концентрованої соляної кислоти. З'являється помаранчеве забарвлення, що поступово переходить в темно-червоне. Потім додають 1 мл хлороформу і збовтують. Спостерігають за забарвленням хлороформного шару.

Тетрациклін

- До 5 крапель розчину (0,5%) додають 1 краплю 5%-го спиртового розчину хлорного заліза. Спостерігають за появою забарвлення.
- До 5-10 мг порошку додають 10 крапель концентрованої сірчаної кислоти. Спостерігають за забарвленням рідини.

Пеніцилін

- До 5-6 крапель водного розчину антибіотика (5-10 мкг / мл) додають

1 краплю реактиву, що складається з 1 мл 1 М розчину гідроксиламіну солянокислого і 0,3 мл 1 М розчину гідроксиду натрію. Через 2-3 хв додають 1 краплю 1 М розчину оцтової кислоти і після перемішування – 1 краплю розчину нітрату міді (5%). Спостерігають за появою осаду та його забарвленням.

- До 5 крапель антибіотика додають 2 краплі 5%-го розчину гідроксиламіну. Суміш нагрівають до кипіння. Після охолодження додають 1 краплю 5%-го розчину хлорного заліза. Спостерігають за забарвленням, що з'являється.

- До 2 крапель розчину пеніциліну додають дві краплі концентрованого розчину їдкого натру і кип'ятять 1-2 хв. Після охолодження додають по краплях 5%-й розчин нітропрусиду натрію. Спостерігають за появою забарвлення та подальшими його змінами.

Ампіцилін

- 0,02 г ампіциліну розчиняють в 2 мл води, додають 2 мл свіжоприготовленого 0,25%-го нінгідрину і кип'ятять 2-3 хв. Спостерігають за появою забарвлення.

- 0,01 г порошку розчиняють в 1 мл води і додають 1 мл реактиву Фелінга, спостерігають за забарвленням, яке з'являється відразу ж.

Цефалоспорини

- До 20 мг речовини додають декілька крапель 80%-го розчину сірчаної кислоти, що містить 1% азотної кислоти. Спостерігають за появою забарвлення.

- До 20 мг речовини додають 5 крапель 1%-го розчину оцтової кислоти, 2 краплі 1%-го розчину сульфату міді і 1 краплю 2 н розчину гідроксиду натрію. Спостерігають за появою забарвлення.

Стрептоміцин

- Реакція на наявність гуанідинових груп. До 3 крапель 1%-го водного розчину стрептоміцину додають 3 краплі 10%-го гідроксиду натрію, 3 краплі 0,1%-го спиртового розчину α -нафтолу і 3-9 крапель 2%-го свіжоприготовленого розчину гіпоброміду натрію. Спостерігають за появою забарвлення.

- До 5-6 крапель досліджуваного розчину (0,5% або 5-10 мкг/мл) додають 2-3 краплі розчину 10%-го розчину гідроксиду натрію і нагрівають на водяній бані 3 хв. Після охолодження додають 5-6 крапель розведеної (10%) сірчаної кислоти і 2-3 краплі розчину хлорного заліза (3%). Спостерігають за появою забарвлення.

- До 5-6 крапель розчину додають 0,5 мл розчину хлориду барію (5%).
Спостерігають за появою осаду.

Сульфаніламід (антимікробні препарати, що не належать до антибіотиків)

- До 0,05 г порошку додають по 4-5 крапель води та розведеної соляної кислоти, 5-6 крапель 0,1 М розчину нітриту натрію і 4-6 крапель розчину аміаку. Спостерігають за появою забарвлення.

- До 0,1 г порошку додають 1 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію, збовтують 1 хв. і фільтрують. До фільтрату додають 5-6 крапель розчину сульфату міді. Утворюється осад різних кольорів: у норсульфазолу – брудно-фіолетовий; у етазолу – трав'янисто-зелений; у сульфадимезину – жовтувато-зелений.

Стрептоцид (антимікробний препарат, що не належить до антибіотиків)

- До 1 мл розчину додають 5-6 крапель розведеної соляної кислоти, 2-3 краплі 0,1%-го нітриту натрію і до 0,1 мл отриманої суміші додають 1-2 мл лужного розчину нафтолу. Спостерігають за появою забарвлення.

Левоміцетин

- До 0,5 мл розчину левоміцетину (0,015%) додають 1-2 мл розведеної соляної кислоти, 0,1 г цинкового пилю і нагрівають на водяній бані 2-3 хв. Після охолодження розчин фільтрують. До фільтрату додають 2-3 краплі 0,1 М розчину нітриту натрію і 0,3-0,5 мл отриманої суміші вливають в 1-2 мл розчину β-нафтолу, приготованого на 10%-му розчині натрію гідроксиду. Спостерігають за появою забарвлення.

- 10 мг левоміцетину струшують з 1 мл 5%-го розчину сульфату міді (II), додають 1 мл розчину гідроксиду натрію і струшують 1 хв. Спостерігають за появою осаду та його кольором.

Саліцилова кислота (антимікробний препарат, що не належить до антибіотиків)

- До 4-5 крапель розчину додають дві краплі 3%-го розчину хлориду окисного заліза. Спостерігають за появою забарвлення.

Гентаміцин

- До 1 мл розчину антибіотика (5-10 мкг/мл) додають 0,2 мл 0,2 М розчину гідроксиду натрію, нагрівають 10 хв. на водяній бані і охолоджують 3 хв під струменем холодної води. Потім додають 0,8 мл 1%-го розчину залізоамонійних квасців у 0,275 М розчині сірчаної кислоти і перемішують. Реєструють зміну забарвлення.

Лінкоміцин

• У пробірку з притертою пробкою відбирають 1,5 мл досліджуваного розчину антибіотика, додають 0,05 мл насиченого розчину вуглекислого натрію, 0,15 мл розведеного (1:1) реактиву Фоліна і нагрівають на водяній бані протягом 15 хв. Розчин охолоджують і добре перемішують. Спостерігають за появою забарвлення, яке свідчить про наявність антибіотика.

Ністатин

• До 0,05 г порошку додають 1-2 мл крижаної оцтової кислоти і 5-6 крапель 0,1%-го розчину перманганату калію. Розчин швидко знебарвлюється

Результати роботи представляють у вигляді таблиці 5 та роблять висновок.

Таблиця 5. Результати якісного аналізу досліджуваної сполуки

№	Результат якісної реакції		Висновок	Механізм дії даної сполуки
	Еталон	Дослідна сполука		
1				

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Назвіть основні групи антибіотиків за хімічною будовою.
2. Охарактеризуйте групу β -лактамних антибіотиків (особливість хімічної будови, спектр дії природних і напівсинтетичних антибіотиків)
3. Особливість хімічної будови тетрациклінових антибіотиків, різноманітність груп, спектру і механізму їх дії).
4. Чому сульфаніламід, стрептоцид і саліцилова кислота не відносять до антибіотиків?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

ВИДІЛЕННЯ АКТИНОМІЦЕТІВ – ПРОДУЦЕНТІВ АНТИБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ АНТИМІКРОБНОГО СПЕКТРУ

Актиноміцети – велика і різноманітна група Γ^+ мікроорганізмів, які відносяться до 2-ї категорії за визначником Берджі (9 видання) і представлені 22-29 групами.

Актиноміцети відрізняються один від одного за морфологією клітин, способом розвитку, розмноження, фізіологічними особливостями і культуральними властивостями. За сукупністю цих ознак актиноміцети поділяються на нижчі і вищі.

Актиноміцети – єдина група прокаріотів, що здатні утворювати міцелій. Діаметр міцелію актиноміцетів набагато менше, ніж у грибів, і не перевищує 2,0 мкм, найчастіше зустрічається діаметр 0,7-0,8 мкм. Нижча група актиноміцетів формує нестабільний септований міцелій, який швидко розпадається на окремі паличкоподібні клітини. Вищі актиноміцети, формують несептований, але добре розвинений і стабільний міцелій, який диференціюється на повітряний і субстратний. Повітряний міцелій товщий за субстратний, гідрофобний і містить більше ДНК і ферментів.

Розмножуються актиноміцети вегетативним (обривками міцелію, що містять генетичний матеріал) або безстатевим способом (спорами). За способом розмноження, як і за здатністю формувати міцелій, актиноміцети подібні до грибів. Спори нижчих актиноміцетів формуються на основі фрагментованого міцелію, що розпався. Вони мають потовщену оболонку. Спори у вищих актиноміцетів утворюються екзогенно на спеціальних гіфах повітряного міцелію – спороносцях – конідіях. Спороносці можуть мати різноманітну форму: пряму, спіральну, хвилясту, у вигляді пучків і т. д. (рис 3). Форма спороносців індивідуальна для кожного виду актиноміцетів і є важливою таксономічною ознакою для їх ідентифікації.

Відомо два способи утворення спор у вищих актиноміцетів роду *Streptomyces*, який об'єднує найбільше число представників:

- Послідовний, коли від кінця спороносця поперечною перегородкою відділяється кінчик гіфа, з якого формується спора. Потім під першою спорою відділяється новий фрагмент з формуванням другої спори, і так послідовно формується ланцюжок спор в спороносці (р. *Micromonospora*).
- Одноетапний, коли в спороносці утворюються поперечні перегородки по всій довжині, відбувається потовщення їх стінок і одночасне утворення 30-100 спор.

Спори стрептоміцетів поділяються на 4 групи: гладкі; з бородавчастою поверхнею; з шиповидними виростами; з волосоподібними виростами. Вони стійкі до низької вологості і температури. У несприятливих умовах можуть довгий час перебувати в стані анабіозу.

На поверхні щільного поживного середовища актиноміцети утворюють щільні, шкірясті колонії, що міцно врастають в поживне середовище. Поверхня колоній може бути гладкою, складчастою, горбистою і зернистою, з пігментацією або без неї. Різні види актиноміцетів мають один - два пігменти. Можуть зустрічатися колонії з різними відтінками чорного, фіолетового, синього, пурпурного, червоного, помаранчевого, жовтого, зеленого, бурого, сірого і білого кольору. У хромофорних актиноміцетів, пігмент яких

утворюється в протопласті, забарвлюється тільки колонія. У актиноміцетів, які синтезують водорозчинні екзопігменти, забарвлюється середовище.

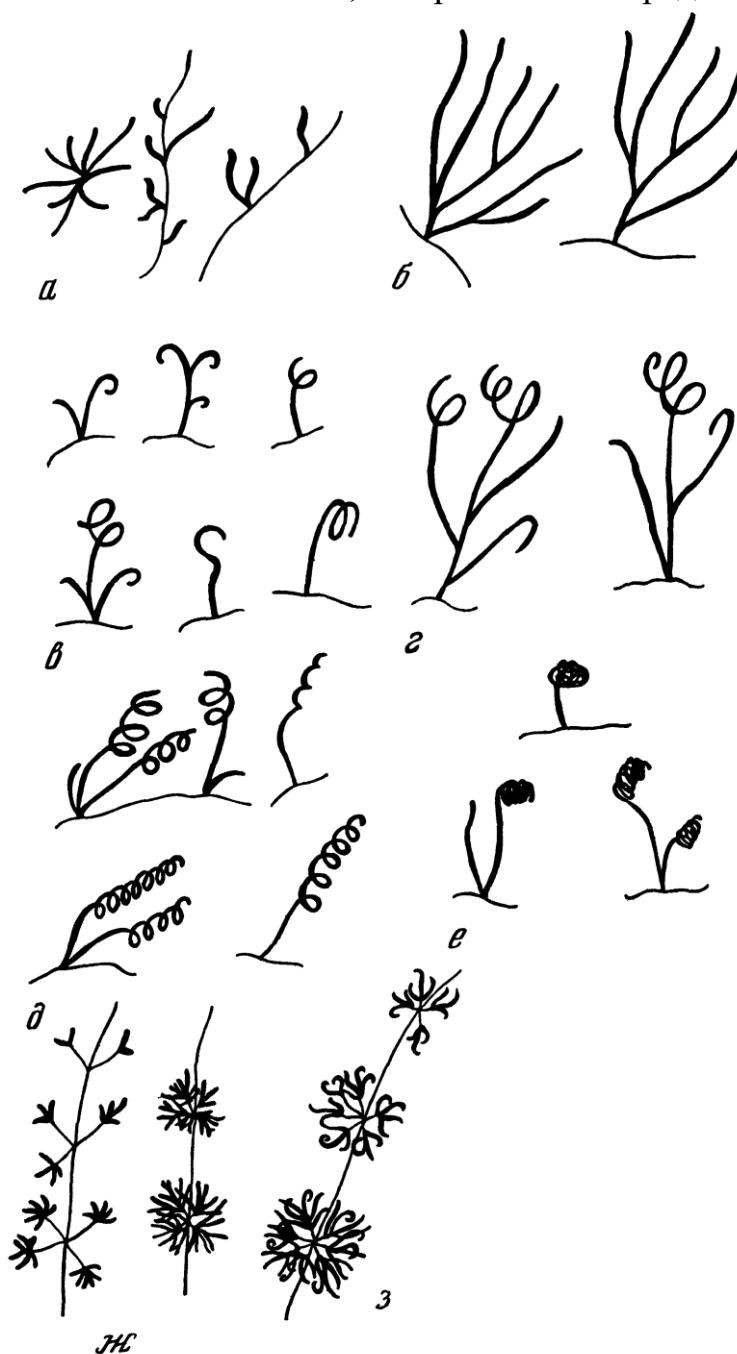


Рис. 3. Форма і розташування спораносців у актиноміцетів

а – прямі, короткі; б – прямі, довгі, розгалужені; в – короткі, у вигляді гачків і коротких неправильних спіралей; г – довгі, у вигляді гачків і неправильних спіралей; д – у вигляді правильних спіралей; е – зі щільними стисненими спіралями; ж – мичкуваті, прямі; з – мичкуваті, мають гачки, спіралі в 1-1,5 оберти.

Актиноміцети відрізняються за своїми потребами в поживних речовинах. Вони здатні розкласти білки, сечовину і простіші азотовмісні сполуки.

Кращим джерелом вуглецевого живлення для актиноміцетів є глюкоза, мальтоза, крохмаль, гліцерин або маніт. Актиноміцети, як і переважна більшість прокаріотів, краще розвиваються при нейтральній реакції середовища, але серед них є ацидофільні і алкалофільні види.

По відношенню до кисню більшість актиноміцетів є аеробами, серед патогенних зустрічаються анаероби і мікроаерофіли.

В метаболізмі прокаріотів виявлені рідкісні біохімічні реакції. Наприклад, зустрічається гетеротрофний шлях фіксації CO₂, а також здатність до азотфіксації. Серед актиноміцетів часто зустрічається внутрішньовидова диференціація.

Особливістю актиноміцетів є здатність до синтезу біологічно-активних речовин. Багато актиноміцети використовуються при отриманні БАР: вітамінів, гормонів, амінокислот, ферментів, пігментів, запашних сполук. Актиноміцети – активні продуценти антибіотиків, що є результатом реалізації спадково закріпленого активного антагонізму, який сформувався в процесі філогенетичного розвитку. Актиноміцети утворюють до половини відомих науці антимікробних речовин. Вони є продуцентами ряду полієнових антибіотиків таких як: ністатин (продуцент *S. noursei*), амфотерицин В (продуцент *S. nodosus*), натаміцин (продуцент *S. natalensis*). Продукують ряд антибактеріальних антибіотиків: еритроміцин (продуцент *S. erythreus*), неоміцин (продуцент *S. fradiae*), стрептоміцин (продуцент *S. griseus*), тетрациклін (продуцент *S. rimosus* і *S. aureofaciens*), хлорамфенікол (продуцент *S. venezuelae*) і ряд інших. Серед актиноміцетів є продуценти і деяких протипухлинних антибіотиків, таких як: даунорубіцин (продуценти *S. peucetius* і *S. coeruleorubidus*), доксорубіцин (продуценти *S. coeruleorubidus* і *S. peucetius*), блеоміцин (*S. verticillus*).

Актиноміцети широко поширені в ґрунті, повітрі, водоймах, рослинних і тваринних залишках. Вони беруть безпосередню участь в ґрунтоутворенні (50% гумусу – результат діяльності актиноміцетів). Серед них є патогенні форми.

ЗАВДАННЯ

Виділення актиноміцетів-антагоністів з природного джерела. Для реалізації поставленого завдання необхідно:

1. Відібрати зразки ґрунту.
2. Підготувати поживні середовища для культивування актиноміцетів і тест-культур.
3. Виділити чисті культури актиноміцетів – продуцентів антимікробних сполук.
4. Підготувати тест-культури мікроорганізмів.

5. Визначити антимікробний спектр дії виділених культур актиноміцетів.

ХІД РОБОТИ

Відбір зразків ґрунту

Для виділення актиноміцетів-антагоністів відбирають по 2 зразки добре удобреного й обробленого ґрунту. При відборі зразків знімають поверхневий прошарок ґрунту. Відбір проводять з глибини 5-10 см. На чистому паперовому пакеті, куди поміщається ґрунт, зазначають дату забору зразка, назву місця, тип ґрунту, рослинність.

Підготовка поживних середовищ для актиноміцетів

При виділенні з природних джерел продуцентів антибіотиків використовують поживні середовища, що створюють селективні умови для росту мікроорганізмів бажаної групи.

Для виділення актиноміцетів у даній роботі використовують синтетичне середовище та модифіковане середовище Чапека, що придатне для вирощування актиноміцетів і багатьох тест-мікробів. Склад даних середовищ наведено в таблиці 6. Кожна бригада готує по 100 мл кожного середовища.

Таблиця 6. Середовища для вирощування актиноміцетів

1. Синтетичне середовище		2. Середовище Чапека (модифіковане)	
Речовина	Концентрація, г/л	Речовина	Концентрація, г/л
Крохмаль розчинний	20,0	Маніт	20,0
KNO ₃	1,0	K ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5	KNO ₃	3,0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	MgSO ₄	0,5
NaCl	0,5	NaCl	0,5
FeSO ₄	0,01	FeSO ₄	0,01
Агар-агар	20,0	CaCO ₃	3,0
Вода водопровідна, рН 7	1л	Основний бульйон Хоттінгера	20,0
		Агар-агар	20,0
		Вода водопровідна, рН 7	1л

Виділення актиноміцетів проводять методом висіву суспензії ґрунту на поверхню агарових пластинок у чашках Петрі. Наважки досліджуваних зразків ґрунту (1 г) вносять в колбу зі 100 мл стерильної водопровідної води і струшують протягом 5 хв. З отриманої суспензії готують ряд послідовних десятикратних розведень – 1:1000, 1:10000, 1:100000 і 1:1000000.

Для отримання зазначених розведень беруть 4 пробірки з 4,5 мл стерильної водопровідної води в кожній. Потім 0,5 мл суспензії з вихідної колби, де мікрофлора вже розведена в 100 разів, переносять в першу пробірку. При цьому утворюється розведення 1:1000. Потім із першої пробірки новою піпеткою переносять 0,5 мл суспензії у другу пробірку. Одержують розведення 1:10000 і т.д.

З трьох останніх розведень кожного досліджуваного зразка проводять висів суспензій в обсязі 0,05 мл на зазначені вище два агаризованих середовища, розлиті в чашки Петрі. Нанесену на агар суспензію в асептичних умовах старанно розтирають шпателем. Посіви поміщають у термостат (температура 26-28 °С) на 5-10 діб. На чашках записують використане середовище, розведення суспензії, з якої зроблено висів, і дату висіву.

Після інкубації чашки переглядають, підраховують кількість колоній актиноміцетів, що виростили при різних розведеннях. З урахуванням розведення визначають число актиноміцетів у 1 г кожного досліджуваного зразка ґрунту.

Розглядають колонії актиноміцетів. Колонії актиноміцетів шкірясті, щільні, врастають міцелієм у середовище, тому петлею знімаються важко. Більшість колоній має пухнастий, бархатистий наліт повітряного міцелію, що може мати різне забарвлення. При перегляді посівів необхідно врахувати частоту виявлення колоній різного забарвлення.

З метою виявлення антагоністичних форм актиноміцетів у досліджуваних зразках ґрунту вивчають колонії актиноміцетів. Для цього ізольовані колонії (3-5 шт.) з чашок Петрі переносять на скошене в пробірках агаризоване середовище Чапека. Чисті культури готують з кожної окремої колонії. Пробірки нумерують і поміщують на 7-10 діб до термостату (температура – 26 - 28 °С).

Після закінчення інкубації культури перевіряють на чистоту мікроскопічними методами в імерсійній системі.

Визначення антимікробного спектру актиноміцетів

Антимікробний спектр виділених чистих культур актиноміцетів-антагоністів вивчають методом перпендикулярних штрихів.

Чисті культури актиноміцетів з пробірок переносять на середовище Чапека (маніт замінений на глюкозу) в чашки Петрі. Посів здійснюють у

вигляді штриха, проведеного по діаметру чашки. Посіяні культури поміщають в термостат на 5-10 діб при температурі 26-28 °С.

Після того як актиноміцети виростуть і утворять антибіотичну речовину (зазвичай через 5-10 діб інкубації), перпендикулярно до лінії їх росту роблять штрихові посіви різних тест-мікроорганізмів.

Підготовка тест-мікроорганізмів

У якості тест-об'єкта використовують 5-6-добові культури мікроорганізмів із різних таксономічних груп, що вирощені на модифікованому середовищі Чапека для тест культур або МПА в пробірці на косячку.

Із зазначених культур за стандартом каламутності готують суспензії, що містять 500 млн. мікробних клітин у 1 мл фізіологічного розчину.

Тест-культури, які використовують у роботі, наведені у таблиці 7.

Таблиця 7. Тест-культури мікроорганізмів

№	Бактерії (МПА)	Г ⁺ / Г ⁻
1	<i>Escherichia coli</i>	Г ⁻
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Г ⁺
3	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Г ⁺
4	<i>Bacillus cereus</i>	Г ⁺
5	<i>Bacillus subtilis</i>	Г ⁺
6	<i>Bacillus mycoides</i>	Г ⁺
7	<i>Sarcina flava</i>	Г ⁺

При посіві з обох сторін лінії росту актиноміцету підсівають по 4 різних суспензії тест-культур (500 млн. КУО/мл). Посів проводять у напрямку від стінок чашки Петрі до лінії росту продуцента, щоб усунути ймовірність внесення культури актиноміцету вздовж лінії посіву тест-культури. Чашки поміщають в термостат при температурі 37 °С на 24-48 годин.

При обліку результатів необхідно визначити спектр антагоністичної дії кожної досліджуваної культури актиноміцету. Для цього аналізують ріст мікроорганізмів: тест-об'єкти, нечутливі до антибіотичної речовини, ростуть біля штриха досліджуваного актиноміцету. Чутливі організми розвиваються на більшій або меншій відстані від штриха актиноміцету. Для оцінки рівня чутливості кожного тест-об'єкта необхідно виміряти в міліметрах розмір зони пригнічення його росту.

Відсутність зон затримки росту всіх тест-культур свідчить про відсутність антимікробної активності актиноміцету.

Дані про спектр і рівні антибіотичної дії виділених актиноміцетів подають у вигляді таблиці 8 та роблять висновок.

Таблиця 8. Антагоністичні спектри дії виділених актиноміцетів

№ досліджуваної культури	Зона пригнічення росту тест-об'єкта, мм						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus mycooides</i>	<i>Sarcina flava</i>
1.							

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Дайте загальну характеристику мікроорганізмам групи актиноміцетів.
2. Яка природа активного і пасивного антагонізму.
3. Наведіть приклади антибіотиків, продуцентами яких є актиноміцети.
4. Охарактеризуйте методи виділення мікробів–антагоністів з природних умов.
5. Яким чином при виділенні актиноміцетів можна позбавитися від інших мікроорганізмів і спор грибів.
6. У чому відмінності культивування актиноміцетів від інших бактерій, наприклад, *E.coli*.
7. На чому заснований принцип визначення антагонізму актиноміцетів методом перпендикулярних штрихів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

БІОСИНТЕЗ АНТИБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН В УМОВАХ ПОВЕРХНЕВОГО ТА ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Культивування мікроорганізмів здійснюють поверхневим або глибинним способом. Велике значення при виборі способу культивування має відношення культури мікроорганізмів до молекулярного кисню (аеробна, анаеробна, мікроаерофільна або аеротолерантна) і мета культивування – накопичення клітинної маси або отримання екзометаболітів.

При культивуванні поверхневим способом мікроорганізми вирощуються на поверхні щільного, сипкого або рідкого середовища. Аерація культури в закритій системі при цьому здійснюється за рахунок повітря, що знаходиться над точкою росту культури. У рідких середовищах аеробні мікроорганізми, що ростуть на поверхні культури, частково використовують і кисень, що знаходиться в рідкій фазі.

Поверхнєве культивування мікроорганізмів частіше застосовується в лабораторних умовах для виділення чистої культури, вивчення архітектоніки колоній, ведення музейних культур, накопичення біомаси в невеликих обсягах.

При глибинному культивуванні мікроорганізми розвиваються в товщі поживного середовища. Глибинне культивування здійснюється як в стаціонарних умовах, так і в умовах примусового перемішування для здійснення кращого масообміну. Також, як і при поверхневому культивуванні, вибір методу глибинного культивування визначається відношенням культури до кисню. Найбільш широко використовуваний в лабораторній практиці спосіб глибинного культивування аеробних культур – вирощування мікроорганізмів на качалках, які забезпечують струшування або обертання колб і пробірок зі швидкістю 100-200 об / хв і більше. Чим більша швидкість обертання, тим вище насичення середовища киснем. Ефективніша аерація поживного середовища досягається шляхом продування через його товщу стерильного повітря. Цей спосіб також використовується в лабораторних дослідженнях, але особливо широке застосування він знайшов у промисловій мікробіології.

Вибір способу культивування актиноміцетів-продуцентів антибіотиків, як і вибір поживного середовища і умов культивування, визначають швидкість накопичення біомаси та вихід цільового продукту.

ЗАВДАННЯ

Для встановлення ролі умов культивування актиноміцетів на біосинтез антибіотиків необхідно реалізувати наступні завдання:

1. Приготувати поживне середовище
2. Приготувати інокулюм
3. Дослідити біосинтез антибіотичних речовин у виділених культур актиноміцетів в умовах поверхневого та глибинного культивування
4. Визначити антибіотичну активність культуральних рідин методом серійних розведень у щільному поживному середовищі.

ХІД РОБОТИ

Приготувати поживне середовище

Поверхнєве культивування здійснюється на рідкому середовищі Чапека, що розлите в колби по 100 мл. Склад середовища див. табл.7, але маніт слід замінити на глюкозу в тій же концентрації. Для здійснення глибинного культивування готують середовища 1 та 2 наступного складу (табл. 9) на водопровідній воді.

Таблиця 9. Середовище для культивування актиноміцетів

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

Приготування інокулюму

Біосинтез антибіотичних речовин досліджують, використовуючи одну з виділених із ґрунту культур актиноміцету, яка приводила до затримки росту тест-культури з найбільшою ефективністю.

З метою дослідження утворення антибіотиків роблять посів 7-10-добової культури актиноміцету, вирощеної на косячках, у колби з рідкими середовищами для поверхневого та глибинного культивування. Засів проводять шматочками середовища з вирощеною культурою актиноміцету. Для цього мікробіологічним гачком вирізають блоки культури разом із середовищем (приблизно 2 см) та асептично вносять їх у колби.

Накопичення антибіотичних речовин досліджують в динаміці при поверхневому і глибинному культивуванні.

Поверхнєве культивування

Досліджувану культуру актиноміцету засівають на рідке середовище Чапека, розлите в колби по 100 мл. Колби поміщають в термостат на 7 діб. Протягом тижня спостерігають за культурою та відзначають час появи плівки, її характер. З метою виявлення антибіотика і визначення його концентрації проводять відбір проб культуральної рідини на 5-ту і 7-му добу культивування.

Глибинне культивування

Для виявлення біосинтезу антибіотиків актиноміцетами в умовах глибинного культивування досліджувану культуру засівають в колби, що містять по 20 мл середовищ 1 та 2 (див. табл. 9).

Колби із засіяним поживним середовищем поміщають на качалку (220 - 240 об/хв.). При цьому середовище в колбах постійно струшується і

перемішується, завдяки чому добре аерується. Вирощування актиноміцетів проводять при 28 °С протягом 7 діб.

Для виявлення антибіотика на 5-ту і 7-му добу культивування з кожної колби відбирають по 2 мл культуральної рідини. Для уникнення потрапляння до проби культуральної рідини міцелію використовують піпетки зі вставленою в один кінець стерильною ватою, через яку відбувається відфільтровування рідини при відборі, або центрифугують проби при 3000 об. / хв.. протягом 10 хв.

Відібрані культуральні рідини можна зберігати в холодильнику при -5 °С протягом 2-3 днів.

Визначення антибіотичної активності культуральних рідин методом серійних розведень в МПА

Для визначення антибіотичної активності культуральних рідин використовують метод серійних розведень, що є одним із найбільш простих і поширених методів.

Принцип методу полягає в тому, що досліджувані культуральні рідини з невідомою концентрацією антибіотику послідовно розводять в ряді пробірок із поживним середовищем (щільним або рідким), куди потім підсівають суспензію тест-культури з концентрацією 500 млн. КУО/мл. Після добової інкубації посівів при 37 °С за затримкою росту тест-культури визначають наявність антибіотика в досліджуваних рідинах.

Концентрація антибіотика виражається титром.

Антибіотичний титр – найбільше розведення досліджуваної рідини, при якому ще не пригнічується ріст тест-культури.

Постановка методу серійних розведень в МПА

Визначають антибіотичну активність трьох культуральних рідин досліджуваного актиноміцету, отриманих на різних поживних середовищах при 2-х режимах культивування. На першому занятті визначають антибіотичний титр культуральної рідини, відібраної на 5 добу культивування, на другому – на 7 добу культивування.

1. В 10 пробірок, розташованих в штативі, асептично розливають по 1 мл розплавленого м'ясо-пептонного агару. Щоб не допустити застигання середовища, пробірки з розплавленим МПА поміщають на водяну баню при температурі 50°С.

2. Готують **вихідне розведення** досліджуваної культуральної рідини в 5 разів (1:5). З цією метою 1 мл культуральної рідини, що не містить міцелію, вносять у пробірку з 4 мл стерильної дистильованої води. Із вихідного розведення (1:5) готують ряд наступних розведень культуральної рідини: 1:10,

1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Для цього в ряд пробірок розливають по 2 мл стерильної дистильованої води. Потім, користуючись кінцевими піпетками, відбирають 2 мл вихідного розведення досліджуваної рідини (1:5) і переносять в першу пробірку, перемішують – отримують розведення культуральної рідини 1:10. Із пробірки з розведенням 1:10 новою піпеткою переносять 2 мл розчину в наступну пробірку з 2 мл води. Аналогічно роблять ряд серійних розведень до 1:160.

3. Вносять різні розведення в пробірки з розплавленим МПА. Для цього, використовуючи одну піпетку, починаючи з більшого розведення до меншого, вносять по 1 мл розчину культуральної рідини в пробірки з МПА. При цьому розведення культуральної рідини в пробірках з МПА збільшуються в 2 рази (від 1:20 до 1:320). Для отримання розведення 1:10 в пробірку з МПА вносять 1 мл вихідного розведення (1:5).

ВВ! Після кожного внесення розчину культуральної рідини в пробірку з МПА її швидко перемішують і кладуть в похиле положення на скошувач для отримання «косячка».

На пробірках із застиглими косячками зазначають номер досліджуваної культуральної рідини і порядкові номери, що відповідають розведенням 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

5. На застигли косячки проводять штриховий посів суспензії тест-культури. У якості тест-культури використовують мікроорганізм, у відношенні якого даний актиноміцет виявляє найбільшу антимікробну активність (див. результати лабораторної роботи №4), із добової культури якого готують суспензію густиною 500 млн. КУО/мл за стандартом каламутності. Пробірки поміщають у термостат при 37 °С. Контроль росту проводять через 24 години.

6. Антибіотичний титр визначають за значенням найбільшого розведення при якому відсутній ріст тест-культури.

Для визначення антибіотичного титру можна використовувати середню величину між максимальним розведенням, при якому ріст відсутній, і розведенням, при якому ріст починається. Наприклад, тест-культура починає рости в 5-й пробірці (розведення 1:160). При розведенні 1:80 ріст відсутній. Антибіотичний титр культуральної рідини в цьому випадку буде дорівнювати:

$$\frac{80 + 160}{2} = 120 \text{ одиниць розведення}$$

Отримані дані представляють у вигляді таблиці 10.

У висновку зазначають, за яких умов і на яких середовищах в досліджуваної культури актиноміцету виявлена найвища продукція антибіотика.

Таблиця 10. Антибіотична активність актиноміцету на щільних середовищах по відношенню до _____ (приклад)

№ п/п	Середовище	Умови культивування	Терміни відбору (доба)	Титр антибіотичної активності (розведення)
1	Чапека	Поверхнєве	5	1:10
			7	1:40
2	Соєве	Глибинне	4	1:20
			7	1:80
3	Крохмально-соєве	Глибинне	4	1:40
			7	1:320

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Дайте характеристику глибинного та поверхнєвого культивування.
2. Яким чином регулюється аерація при глибинному і поверхнєвому культивуванні при періодичному режимі культивування.
3. Причини піноутворення при вирощуванні актиноміцетів і методи піногасіння.
4. Актинофагія і методи боротьби з нею при вирощуванні актиноміцетів.
5. Як визначають активність антибіотиків в процесі росту культури-продуцента.
6. Що розуміють під антибіотичним титром антибіотика.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АКТИНОМІЦЕТІВ

Ідентифікація – це визначення видової або типової приналежності мікроорганізму. Видова ідентифікація багатьох родів актиноміцетів ще не розроблена. Приналежність актиноміцетів до роду проводиться за морфологічними, культуральними, біохімічними, серологічними і патогенними ознаками. Важливими характеристиками також є антагоністичні властивості та специфіка синтезованих антибіотиків.

ЗАВДАННЯ:

1. Визначити морфологічні, культуральні, біохімічні ознаки досліджуваних культур актиноміцетів.
2. На основі досліджених ознак встановити за визначником актиноміцетів Гаузе Ф. Г. потенційну родову та видову приналежність актиноміцетів.

ХІД РОБОТИ

Культивування актиноміцетів

Досліджувані культури висівають у вигляді штриха на поверхню двох агаризованих середовищ, розлитих у чашки Петрі (табл. 11)

Таблиця 11. Середовища для культивування актиноміцетів

Речовина	Концентрація, г/л	Речовина	Концентрація, г/л
Мінеральний агар 1 (Гаузе 1)		Органічний агар 2 (Гаузе 2)	
Крохмаль розчинний	20,0	Глюкоза	10,0
KNO ₃	1,0	Пептон	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5	Бульйон Хоттінгера	30,0 мл
MgSO ₄	0,5	NaCl	5,0
NaCl	0,5	Агар-агар	30,0
FeSO ₄	0,01	Вода водопровідна	1 л
Агар-агар	20,0	pH 7,0-7,2	
Вода водопровідна	1 л	Гліцерин-нітратний агар	
pH 7,0-7,2		Гліцерин	30
Вівсяний агар		NaNO ₃	2
Вівсяне борошно	20-65	K ₂ HPO ₄	1
Агар-агар	20	MgSO ₄	0,5
Вода водопровідна	1 л	KCl	0,5
pH 7,2		FeSO ₄	0,01
		Агар-агар	20
		Вода водопровідна	1 л

Посіви інкубують в термостаті при 28 °С протягом двох тижнів.

Дослідження морфологічних ознак

Морфологічні ознаки вивчають в процесі росту культури, а також на живих культурах або на фіксованих препаратах.

1. В процесі росту культури протягом двох тижнів щодня спостерігають і відмічають у протоколі наступні ознаки:

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

На підставі цих властивостей встановлюють приналежність досліджуваних культур актиноміцетів-антагоністів до певної серії відповідно до класифікації актиноміцетів Г. Ф. Гаузе (табл. 12).

Таблиця 12. Серії актиноміцетів

№ пп	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Назва серії
<i>Секція Roseus</i>			
1	Рожево-бузковий	Безбарвний	<i>Lavendulae-roseus</i>
2	Рожевий	Жовтий	<i>Fradiae</i>
3	Рожевий	Бурий	<i>Fuscus</i>
4	Ясно-рожевий	Фіолетовий	<i>Roscoviolaceus</i>
5	Рожевий	Червоний	<i>Ruber</i>
<i>Секція Helvolo-flavus</i>			
6	Жовтувато-зелений або палевий	Безбарвний або забарвлений	<i>Flavus, Helvolus</i>
<i>Секція Albus</i>			
7	Білий	Безбарвний	<i>Albus</i>
8	Білий	Червоний або бурий	<i>Albosporeus</i>
<i>Секція Azuzeus</i>			
9	Блакитний або зелено-блакитний	Безбарвний або забарвлений	<i>Coerulescens, Glaucescens</i>
<i>Секція Cinereus</i>			
10	Сірий	Безбарвний	<i>Achromogenes</i>
11	Сірий	Жовтий	<i>Aureus</i>
12	Сірий	Зеленувато-бурий	<i>Chrysoviallus</i>
13	Сірий	Коричнево-чорний	<i>Chromogenes</i>
14	Сірий	Синьо-фіолетовий або червоно-бурий	<i>Violaceus</i>
<i>Секція Imperfectus</i>			
15	Міцелій відсутній		

2. Вивчення морфологічних ознак в живих культурах

Вивчаються 1-2-добові посіви культур на агаризованому середовищі Гаузе №1. З цією метою на поверхню засіяного середовища накладають покривне скло, на яке наносять краплю імерсійної олії. Цитологічне дослідження проводять за допомогою фазово-контрастного мікроскопа.

Звертають увагу на:

- структуру мікроколоній;
- товщину ниток;
- форму спорноносців;
- форму спор.

3. Вивчення морфологічних ознак у *фіксованих препаратах*

З культур актиноміцетів, що добре виростили на агаризованих середовищах (5-7 діб), готують мазки-відбитки, які дозволяють вивчити будову спорноносців і спор. З цією метою з агару з нальотом актиноміцету вирізають блок і переносять його на предметне скло. До поверхні блока з культурою декілька разів прикладають знежирене предметне скло – утворюється 3-4 послідовних відбитки. Після підсихання відбитки фіксують.

Фіксацію препарату проводять у полум'ї або рідиною Карнуа (6 частин 96%-го спирту, 3 частини хлороформу, 1 частина крижаної оцтової кислоти) протягом 5 хвилин, потім препарат ополіскують 70%-м спиртом і забарвлюють водним розчином метиленового синього (1:1000).

Звертають увагу на те, що цитоплазма забарвлюється в інтенсивно синій колір у молодих гіфах і в блідо-блакитний – у зрілих; генетичні елементи – у блакитний або синій, волутинові зерна – у вишневий, фіолетовий або рожевий. У препараті вивчають будову спорноносців і спор.

Дослідження культуральних та біохімічних властивостей

1. Для вивчення культуральних властивостей проводять посів досліджуваних актиноміцетів на ряд середовищ: картопля (брусок картоплі, простерилізований у полум'ї та, після посіву петлею, поміщений у пробірку), молоко, середовище з желатином (посів уколом), середовище з клітковиною, крохмальний агар (розливають у чашки Петрі та роблять посів по найбільшому діаметру), рідкі середовища з нітратами і сахарозою, склад яких наведено у таблиці 13.

2. Культури на всіх середовищах переглядають і описують через кожні 5 днів протягом 3-4 тижнів.

На **картоплі** вивчають:

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

При вирощуванні актиноміцетів **на молоці** відмічають його зміни:

- зсідання або пептонізацію;
- час появи цих змін.

На **желатині** відзначають:

- розрідження та його характер: пошарове, кратероподібне, мішкоподібне.

Таблиця 13. Середовища для вивчення культуральних і біохімічних властивостей актиноміцетів

Назва	Речовина	Кількість	Назва	Речовина	Кількість
Середовище з желатином	желатин	100 г	Середовище з нітратами	пептон	1,0 г
	пептон	5,0 г		NaCl	0,5 г
	глюкоза	20,0 г		KNO ₃	1,0 г
	вода водопровідна	1л		вода дистильована	1л
	pH	7,0		pH	7,0
Крохмальний агар	розчинний крохмаль	10,0 г	Середовище з сахарозою	K ₂ HPO ₄	0,5г
	K ₂ HPO ₄	0,3г		MgSO ₄	0,5г
	MgSO ₄	1.0 г		KNO ₃	1,0г
	NaCl	0,5 г		NaCl	0,5г
	CaCO ₃	3,0 г		сахароза	20,0г
	агар-агар	20,0г		FeSO ₄	0,01
	вода водопровідна	1л		вода дистильована	1л
	pH	7,2 -7,4		pH	7,2 -7,4

Середовище з клітковиною Смужки фільтрувального паперу у пробірках заливають розчином наступного складу:	K ₂ HPO ₄	0,5г
	MgSO ₄	0,5г
	KNO ₃	1,0г
	NaCl	0,5г
	FeSO ₄	0,01г
	вода водопровідна	1л
	pH	7,2-7,4

На крохмалі визначають його гідроліз на 10-15-у добу вирощування. З цією метою чашки з культурою заливають розчином Люголя – відсутність посиніння навколо штриха вказує на гідроліз крохмалю, розмір цієї зони вимірюється в мм.

Відновлення нітратів до нітритів виявляють на 15-20-у добу за допомогою крохмально-йодної реакції, що базується на здатності нітритів у кислому середовищі окислювати йодистий цинк з виділенням йоду, присутність якого встановлюють за допомогою крохмалю. Для виявлення нітритів до краплі розчину, що містить ZnCl₂, KI та крохмаль, на предметному скельці додають краплю розчину HCl і краплю культуральної рідини. В присутності в середовищі нітритів з'являється синє забарвлення.

Інверсію сахарози та клітковини визначають на 15-20-ту добу росту. Реактиви Фелінга I і II зливають у рівних об'ємах, суміш кип'ятять. До 2 мл

суміші реактивів додають 2 мл досліджуваної культуральної рідини, при підігріванні випадає червоний або жовтий осад окису міді, що вказує на наявність глюкози.

Визначення видової приналежності актиноміцетів

У якості керівництва використовують визначник актиноміцетів Гаузе [5].

Всі отримані результати по даній роботі оформлюють у вигляді протоколу-звіту (додаток 1). Виділені чисті культури актиноміцетів студенти здають викладачу.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ :

1. Визначення яких ознак лежить в основі ідентифікації мікроорганізмів?
2. Які середовища використовують для визначення морфологічних ознак актиноміцетів та чому?
3. На підставі яких властивостей встановлюють приналежність досліджуваних культур актиноміцетів до певної серії?
4. Особливості вивчення морфологічних ознак в живих культурах.
5. Особливості середовищ для дослідження біохімічних ознак актиноміцетів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М.: Наука, 2004. – 528 с.
2. Навашин С. М. Справочник по антибиотикам. 3-е изд., переработ., дополн. / С. М. Навашин, И. П. Фомина. – М.: Медицина, 1974. – 416 с.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) / Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2004. – Т. 6, №4. – с. 306-359.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
5. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillum*, *Chainia* / [Г. Ф. Гаузе, Т. П. Преображенская, М. А. Свешникова и др.]. – М.: Наука, 1983. – 248 с.
6. Валагурова Е. В. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации / Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. – К.: Наукова думка, 2003. – 618 с.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1980 – 213 с.
8. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М: Медицина, 2004. – 576 с.

СХЕМА ОПИСУ АКТИНОМІЦЕТУ

Дата виділення _____

Субстрат, з якого виділений мікроорганізм _____

I. Морфологічні ознаки

1. Організація міцелію	вік	септований, несептований	Гаузе
	вік	септований, несептований	Гаузе середовище
2. Форма спороносців	вік	характеристика	
	вік	характеристика	
3. Форма спор	вік	характеристика	
	вік	характеристика	

II. Культуральні ознаки

Опис колонії на середовищі _____ Гаузе I

назва середовища

Форма краю колонії _____

Пігментація	
Повітряний міцелій	
Субстратний міцелій	
Субстрат	

Ріст на різних середовищах:

№ п/п	Середовище	Вік	Характеристика	Пігментація	
				субстратного міцелію	повітряного міцелію
1.	Гаузе I				
2.	Гаузе II				

Ріст на картоплі

вік	характеристика	пігментація
вік	характеристика	пігментація

Ріст на молоці

вік	утворення згустку	пептонізація
вік	утворення згустку	пептонізація

Розрідження
желатини

вік	наявність/ відсутність	вид розрідження	пігментація
вік	наявність/ відсутність	вид розрідження	пігментація

Ріст на
крохмальному
агарі

вік	наявність/ відсутність	гідроліз	розмір зони гідролізу, мм
вік	наявність/ відсутність	гідроліз	розмір зони гідролізу, мм

Відновлення нітратів в нітри́ти _____

Інверсія сахарози _____

Інверсія клітковини _____