

Определение антибиотической активности микроорганизмов

После того как микроб-антагонист выделен из естественного субстрата, его антибиотическую активность по отношению к различным тест-объектам определяют одним из существующих методов. При этом важно учитывать те факторы, которые влияют на образование антибиотиков. Изучение антибиотических свойств микроорганизмов осуществляют при их культивировании на твердых (агаризированных) или в жидких средах.

Большинство методов определения антибиотической активности связано с культивированием изучаемого организма на агаризированных средах. Здесь мы остановимся лишь на наиболее распространенных методах выявления антибиотических свойств микробов.

Метод перпендикулярных штрихов. Испытуемый организм высевается штрихом (полоской) на поверхность агаровой пластинки чашки Петри. После того как микроорганизм разовьется, перпендикулярно его штриху подсеваются различные тест-организмы. Чашки помещаются в термостат на 20-24 ч. Если изучаемый организм оказывает антимикробное действие в отношении ряда тест-микробов, то последние будут расти вдали от штриха антагониста. Нечувствительные микробы будут развиваться в непосредственной близости от штриха изучаемого организма (рисунок 1). Данный метод используется в практике поиска продуцентов антибиотических веществ, однако он имеет один существенный недостаток. При методе штриха используется одна и та же среда для культивирования изучаемого организма и для роста тест-микробов.

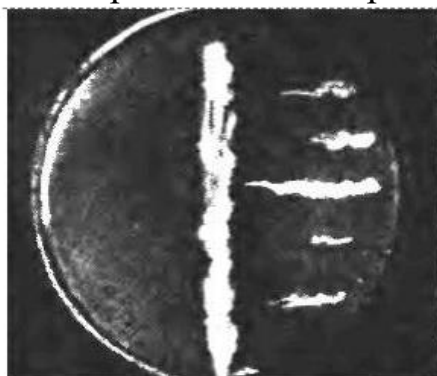


Рисунок 1 – Метод перпендикулярных штрихов для определения антагонистических свойств микроорганизмов

Например, если для образования антибиотика необходима среда с нитратным источником азота, то такая среда может быть совершенно непригодной для развития ряда тест-организмов. И наоборот, многие тест-организмы хорошо растут на среде, состоящей из бульона Хоттингера, но

не все организмы могут продуцировать антибиотик на этой среде. В этом случае можно не определить антибиотическую активность организма, хотя он и обладает этой способностью.

Испытуемый организм (*B.subtilis*, *B.cereus*) высевается штрихом (полоской по центру чашки Петри) на поверхность агаровой пластинки чашки Петри. Через 48-72 часа инкубации исследуемых микроорганизмов при температуре 37 °C, перпендикулярно штриху подсеваются тест-организмы (*E.coli*, *S.aureus*). Чашки помещаются в термостат на 20-24 ч. Если изучаемый организм оказывает антимикробное действие в отношении тест-микробов, то последние будут расти вдали от штриха антагониста

Метод агаровых блочков. Изучаемый организм высевают сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. Среда используется такая, которая благоприятна не только для роста организма, но, самое главное, для образования им антибиотика. Иногда целесообразно высевать организм на разные по составу среды.

После того как организм хорошо вырастет, пробочным сверлом (диаметр примерно 8 мм) вырезают агаровые блочки, которые переносят на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной одним тесторганом. На одну чашку Петри можно разместить 5-7 агаровых блочков. Чашки с агаровыми блочками помещают в термостат на 20-24 ч при температуре, благоприятной для развития тест-организма. Если выделяемый организмом антибиотик подавляет развитие тест-микроба, то вокруг агарового блочка образуется зона отсутствия роста. Чем больше выделяется антибиотика или чем активнее образуемое антибиотическое вещество, тем больше будет диаметр зоны отсутствия роста тест-микроба (рисунок 2).

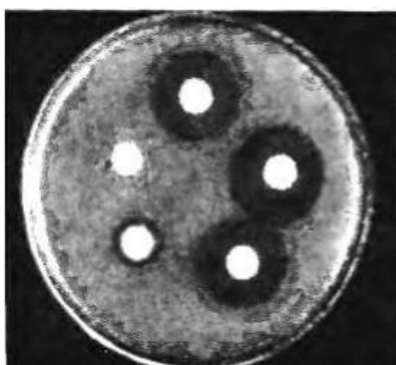


Рисунок 2 – Использование агаровых блочков с выросшей культурой микроба для определения ее антибиотических свойств

Метод высева антагониста на одной половине агаровой пластинки с последующим подсевом тест-микробов штрихами на другой половине агаровой пластинки. Чашка Петри разделяется стеклянной перегородкой пополам. В одну половину наливают питательный агар, благоприятный для

развития изучаемого организма и образования антибиотика; другая половина чашки остается свободной. Иногда поступают иначе. В чашку Петри (без перегородки) наливают питательный агар, затем, когда агар застынет, стерильным скальпелем удаляют одну половину агаровой пластинки. На половину агаровой пластинки высевают сплошным «газоном» изучаемый организм, и засеянные чашки помещают в термостат для получения хорошего развития микроба. После этого на оставшуюся свободную часть пластинки в чашке наливают расплавленный питательный агар, пригодный для развития тесторганизмов, которые высевают штрихами, перпендикулярными границе развития антагониста. Чашки вновь помещают в термостат на 20-24 ч при температуре, благоприятной для развития тест-организмов.

Чувствительные тест-микробы будут расти на определенном расстоянии от антагониста, устойчивые же формы развиваются на протяжении всего штриха (рисунок 3).

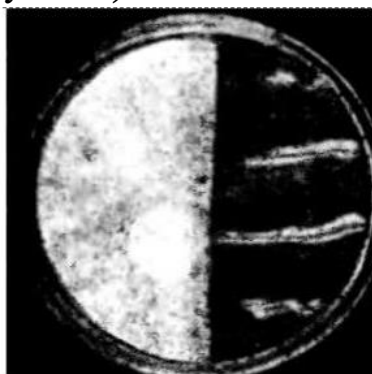


Рисунок 3 – Определение антибиотических свойств микроорганизмов, выросших на половине агаровой пластинки в чашке Петри

Метод агарового блочка, находящегося в центре чашки Петри. Так же, как и в предыдущем методе, в чашке создаются благоприятные условия, как для развития антагониста, так и для развития тест-микроба (рисунок 4).

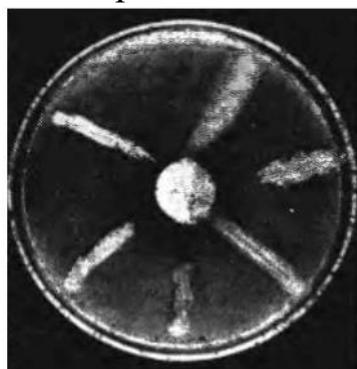


Рисунок 4 – Определение антибиотических свойств микроорганизмов методом агарового блочка, находящегося в центре чашки Петри (по Егорову, 1957)

В чашку Петри наливают питательный агар, пригодный для развития изучаемого организма с образованием антибиотического вещества, из расчета 20-25 мл на стандартную чашку. В застывшем агаре стерильным пробочным сверлом (диаметр 20-22 мм) вырезают агаровые блочки, которые затем переносят в другие стерильные чашки Петри. В центр каждой чашки - помещают по одному такому блоку (рисунок 5 А), затем в эти же чашки на свободную их часть наливают питательный агар, пригодный для развития тест-микробов, с тем расчетом, чтобы уровень этого агара был на 1-1,5 мм ниже уровня блочка (рисунок 5 Б). В случае изучения бактериальных организмов, приготовленные таким способом чашки, необходимо немного подсушить, с тем чтобы удалить конденсационную влагу.

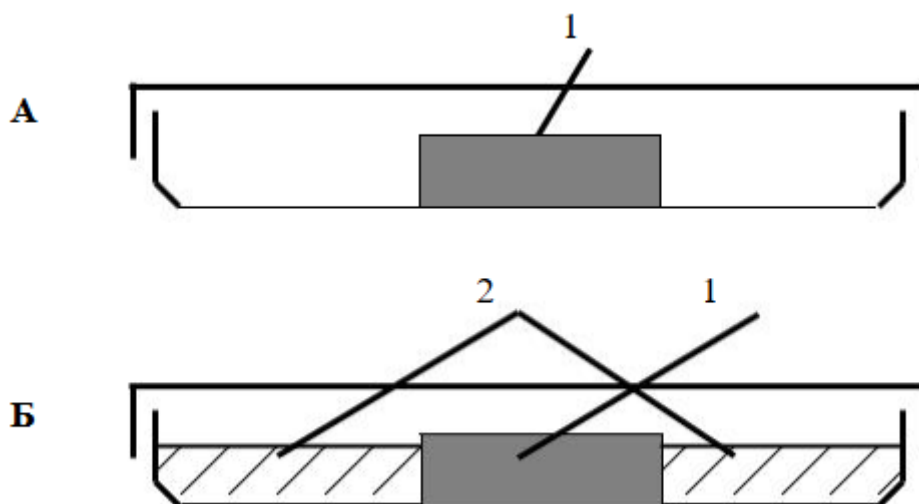


Рисунок 5 – Схема приготовления чашек Петри для определения антибиотических свойств микроорганизмов, выросших на поверхности агарового блочка, находящегося в центре чашки (по Егорову, 1957)

А – помещение агарового блочка в центр стерильной чашки Петри; Б – заливка чашки Петри стерильной агаризованной средой на 1,5 мм ниже уровня агарового блочка. 1 – агаровый блочек; 2 – агаровая среда, благоприятная для роста тест-организма

После того как чашки подготовлены, изучаемый организм высевает микробиологической петлей на поверхность агарового блочка, и чашки помещают в термостат на срок, обеспечивающий нормальное развитие организма. Затем по радиусам агаровой пластинки высевает штрихами тесторганйзмы, и чашки вновь на 20-24 ч помещают в термостат.

Отсутствие роста штриха тест-микроба на том или ином расстоянии от блочка будет указывать на угнетение его антибиотическим веществом изучаемого организма. Если же штрих тест-микроба развивается в непосредственной близости от агарового блочка, то это означает, что

данный организм устойчив к действию антибиотика изучаемого антагониста.

Для изучения актиномицетов рационально агаровые блочки того же диаметра вырезать из среды, на которой уже вырос актиномицет. Посев тестмикробов производят сразу же после внесения агаровой среды в чашку или же чашку предварительно помещают на 18-20 ч в термостат при 26-30 °С, с тем, чтобы накопившийся в блочке антибиотик лучше продиффундировал в окружающий агар.

Испытуемый организм (*B.subtilis*, *B.cereus*) высевается «газоном» в чашке Петри на поверхность МПА (количество МПА 25 мл на чашку). После этого исследуемые микроорганизмы инкубируются в течение 72 ч при температуре 37 °С. Стерильным пробочным сверлом (диаметр 2 см) вырезают агаровые блочки, которые переносят в стерильные чашки Петри. В центр каждой чашки помещают по одному блоку (рисунок 8 А), затем в эти же чашки на свободную их часть наливают МПА, с тем расчетом, чтобы уровень был на 1-1,5 мм ниже уровня блочка (рисунок 8 Б) и производят посев тест-организмов (*E.coli*, *S.aureus*).

Определение антибиотической активности микроорганизмов при культивировании их в жидких питательных средах

При определении антибиотических свойств микроорганизмов, культивируемых в жидких средах, необходимо иметь в виду, что некоторые антибиотики в процессе развития микробов накапливаются внутри клеток продуцента, практически не выделяясь в окружающую среду. Поэтому определение антибиотических свойств организмов следует проводить как в культуральной жидкости, так и в экстрактах. Обычно для экстракции антибиотика из клеток продуцента применяют органические растворители (этиловый спирт, подкисленный этиловый спирт, ацетон и другие вещества).

Для оценки антибиотических свойств микроорганизмов, выросших в жидких средах, можно использовать метод последовательных разведений и метод бумажных дисков.

Метод бумажных дисков. На агаровую пластинку в чашке Петри высевают соответствующий тест-организм. Затем чашки с засеянным тестмикробом подсушивают в термостате при 37 °С в течение 15-20 мин. На одной чашке, т.е. в отношении одного тест-организма, может быть испытано одновременно 6-7 культуральных жидкостей.

Диски из фильтровальной бумаги диаметром 8 мм заготавливают впрок, стерилизуют в автоклаве под давлением выше нормального на одну атмосферу в течение 20-30 мин.

Стерильный диск фильтровальной бумаги захватывают стерильным пинцетом и смачивают в испытуемой культуральной жидкости, затем накладывают на поверхность питательного агара, засеянного тест-

микробом. Чашку с тест-организмом и бумажными дисками помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста тест-организма, на 24 ч, если это бактериальные формы тест-микроба, и на 48-72 ч для грибных или дрожжеподобных форм.

При наличии антибиотического вещества в испытуемой культуральной жидкости вокруг диска образуется зона задержки роста тест-микроба.