

Лабораторная работа №1-2

Тема: «Методы изучения явления антагонизма у микроорганизмов», «Подбор и приготовление питательных сред, Приготовление посевного материала»

Цель работы: Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, с различными классификациями и химическим составом питательных сред, правилами их приготовления и целью использования. Приобрести навыки подготовки посуды для проведения микробиологических исследований. Ознакомиться способами стерилизации питательных сред, посуды, инструментов, с устройством парового стерилизатора и принципом его работы.

Оборудование, материалы: Паровой стерилизатор; сушильный шкаф; посуда: чашки Петри; градуированные пипетки на 1 мл, пробирки, плоскодонные конические или круглодонные колбы разного объема; штатив для пробирок; ватномарлевые пробки; пергаментная бумага; ножницы; вата, нитки, марля, агар-агар; сухие питательные среды: среда Сабуро, мясопептонный агар (МПА), среды Кесслера, Эндо и др.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ.

Разнообразные питательные вещества, в которых нуждаются микроорганизмы и которые используются ими для синтеза основных компонентов клетки, роста, размножения и для получения энергии называются питательными веществами, а среда, содержащая питательные вещества, является питательной средой.

По типу питания микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, относятся к хемоорганогетеротрофам. Это значит, что органические вещества, содержащиеся в питательной среде, являются источником углерода, энергии и электронов. Потребности микроорганизмов в тех или иных органических веществах зависят от их видовой принадлежности, и, следовательно, от наличия в клетках и активности соответствующих ферментных систем.

В качестве источника углерода микроорганизмы используют углеводы, органические и аминокислоты, спирты, липиды и т.д. Как правило, лучше усваиваются низкомолекулярные органические соединения. Высокомолекулярные органические вещества могут быть использованы для питания только теми микроорганизмами, которые способны синтезировать соответствующие гидролитические экзоферменты. Органические вещества и вода являются также основными источниками водорода и кислорода.

Источником азота для хемоорганогетеротрофов могут быть различные органические и минеральные соединения: белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты.

В среде обязательно должны присутствовать макроэлементы (P, S, Ca, Mg, K, Fe, Na, Cl), которые вносятся в питательную среду в виде катионов питательных солей.

Макроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, так как большинство макроэлементов является примесью солей макроэлементов или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах факторы роста. Факторы роста обязательно вносят в среды для культивирования ауксотрофных микроорганизмов (микроорганизмов, которые не способны синтезировать сами те или иные органические вещества, которые необходимы для роста и развития), а также добавляют в питательные среды в малых количествах для ускорения роста микроорганизмов, способных эти вещества синтезировать самостоятельно. К факторам роста относятся отдельные аминокислоты,

пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты, витамины и др., а также природные субстраты, содержащие эти соединения (морковный сок, кукурузный экстракт, автолизат дрожжей, гидролизаты растительного сырья и т.д.).

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест обитания, получения накопительных и чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность для количественного учета микроорганизмов в различных объектах (в пищевых продуктах, в воздухе, в воде, почве). С помощью питательных сред получают также биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов и биологически активные целевые продукты.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;
2. Среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органогенных элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3. Среда должна иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. Среда должна иметь определенное значение pH среды. Среди микроорганизмов различают ацидофилы (кислотолюбивые микроорганизмы), алкалофилы (щелочелюбивые микроорганизмы) и нейтрофилы (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO₃ (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;

5. Среда должна быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. Среда должна обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rh₂), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают rh₂=41, насыщенный водородом rh₂=0. Облигатные анаэробы размножаются при rh₂ не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. Среда должна быть стерильными, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред. По консистенции питательные среды делятся на жидкие, плотные и сыпучие.

Жидкие среды применяются для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов, для обновления долго хранящихся культур, для поддержания и хранения тех чистых культур, которые плохо растут на плотных средах.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культуральных свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированные колонии (колония - популяция микроорганизмов, выросших из одной клетки). Плотные питательные среды используются также для количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, других объектах внешней среды и для хранения чистых культур.

Плотные среды готовятся из жидких путем добавления гелеобразующих веществ: агар-агара, желатина, геля кремнекислого (силикагеля).

Лучшим гелеобразующим веществом является агар-агар, получаемый из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления 96-100 °С и температурой застывания около 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать почти все микроорганизмы. Кроме того, агар-агар очень редко используется микроорганизмами в качестве питательного субстрата. Для уплотнения жидкой среды в нее вносят в зависимости от степени очистки от 1,5 до 2,5 % агар-агара.

В отличие от агар-агара желатин – это вещество белковой природы, которое получается из костей и хрящей животных при их вываривании, поэтому многие микроорганизмы используют желатин в качестве питательного субстрата и к концу культивирования среда с желатином разжижается. Ограниченное использование желатина в качестве уплотнителя для плотных питательных сред связано также с тем, что по сравнению с агар-агаром он образует менее прочный гель, который плавится при 23-25 °С и застывает при 20 °С, в то время как большинство микроорганизмов развивается при температуре от 25 до 37 °С.

Если требуется получить плотные среды, не содержащие органических компонентов, или синтетические среды с определенным количественным и качественным составом, то в качестве уплотнителя применяют кремневокислый гель. Получают его путем смешивания равных объемов соляной кислоты с удельной массой 1,1 и жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) с последующей разливкой по 25-30 мл в чашки Петри и выдержкой 1-2 ч.

Сыпучие среды применяют в основном в промышленной микробиологии. К таким средам относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, смоченный питательным раствором. Такие среды используются для культивирования аэробных микроорганизмов.

По происхождению и составу питательные среды делятся на натуральные (естественные), синтетические (искусственные) и полусинтетические.

Натуральные среды готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав. Натуральные среды используют для выращивания микроорганизмов, накопления биомассы, хранения чистых культур, но они мало пригодны для изучения обменных процессов микроорганизмов. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, различные экстракты, мясной бульон, автолизат дрожжей, молоко, молочная сыворотка, гидролизаты из растительного сырья и т.д. Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также не охмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях. По набору компонентов синтетические питательные среды могут быть сложными (среды для выращивания

молочнокислых бактерий) и довольно простыми. Такие среды применяются для исследования обмена веществ, выяснения закономерностей роста или биосинтеза какого-либо метаболита и т.д. Наиболее часто в практической работе используют синтетическую среду Чапека для выращивания грибов и среду Ридер для дрожжей. Состав этих сред приведен в приложении 2. Основным недостатком синтетических сред является то, что на таких средах микроорганизмы очень долго растут.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов. Цель использования полусинтетических сред та же, что и синтетических. Так как натуральные компоненты вносятся в небольших количествах, то их химический состав не учитывается при изучении обменных процессов тех или иных микроорганизмов.

По назначению среды делятся на универсальные (основные), избирательные (накопительные, элективные) и дифференциально-диагностические.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов. К универсальным средам, используемым для выращивания бактерий, относятся мясопептонный агар и бульон (МПА, МПБ), среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ). Грибы и дрожжи хорошо растут на не охмеленном пивном сусле, сусло-агаре (СА), среде Сабуро.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. Избирательные среды применяют для выделения определенных микроорганизмов из мест их естественного обитания и для получения накопительных культур. В качестве накопительных питательных используют, например жидкие среды Кесслера (используется для накопления бактерий группы кишечной палочки), Мюллера и Кауфмана (для выявления сальмонелл). Элективными средами могут быть плотные питательные среды, такие как молочно-солевой агар (МСА) и желточно-солевой агар (ЖСА) – для выявления и количественного учета в пищевых продуктах коагулазоположительных стафилококков, кровяной агар – для выявления гемолитических стрептококков, агар с гидролизированным молоком и мелом – для количественного учета молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма. Примером таких сред является плотная среда Эндо, применяемая для определения бактерий группы кишечной палочки, в состав которой входит лактоза, насыщенный спиртовой раствор фуксина, обесцвеченного перед добавлением в среду 10 % водным раствором сульфата натрия (образуется бесцветная фуксин-сернистая кислота. Кишечная палочка на такой среде ферментирует лактозу с образованием альдегидов, вследствие чего бесцветная фуксин-сернистая кислота переходит в фуксинсернистое соединение с образованием фуксина, который окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет с металлическим блеском.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Студенты знакомятся с принципами составления и классификацией питательных сред, методами стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря, изучают устройство парового стерилизатора и принцип его работы и кратко конспектируют изложенный в теоретической части материал. Затем готовят посуду, питательные среды и ватно-марлевые пробки для проведения микробиологического анализа.

Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30-40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу или печи Пастера при 165-170⁰С в течение 1-1,5 часа. Стерильную посуду следует хранить в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками в течение не более 30 суток.

Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

Заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками. Далее среды стерилизуют в автоклаве. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

Контрольные вопросы:

1. Что такое питательные среды?
2. Микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, являются хемоорганогетеротрофами. Что это значит?
3. Охарактеризуйте пищевые потребности хемоорганогетеротрофов.
4. Какие требования предъявляются к питательным средам?
5. Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?
6. Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?
7. На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?
8. Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?
9. Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?
10. Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.
11. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?
12. Какими способами можно стерилизовать посуду?
13. Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?
14. Как готовятся питательные среды и посуда для стерилизации?

Лабораторная работа №3-4

Тема: «Изучение антагонистических свойств актиномицетов по отношению к тест-штаммам методом перпендикулярных штрихов», «Изучение антагонистических свойств актиномицетов по отношению к тест-штаммам методом диффузии в агар»

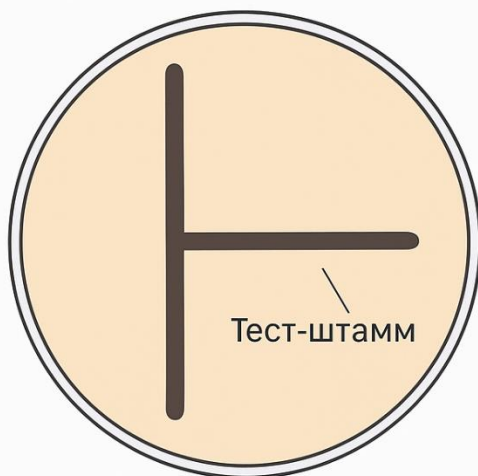
Цель работы: Определить антагонистические свойства актиномицетов по отношению к тест-штаммам микроорганизмов методами перпендикулярных штрихов и диффузии антибиотика в агар.

Антибиотические свойства культур актиномицетов проверяли двумя методами: методом перпендикулярных штрихов на органическом агаре 2 Гаузе и методом диффузии антибиотика в агар [Егоров Н.С., 1986].

Для изучения антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов по диаметру чашки Петри с органической агаровой средой №2 Гаузе наносили культуру актиномицета. Чашку Петри помещали в термостат при температуре 28⁰С. После того, как культура актиномицета вырастала (3-10) суток, перпендикулярно штриху наносили культуры тест-организмов. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37⁰С, результат оценивали через 24 часа по зонам подавления роста тест-организмов.

Для определения антибиотической активности методом диффузии в агар, актиномицеты выращивали в жидких средах при температуре 28⁰С в колбах Эрленмейера объемом 750 мл (объем питательной среды составлял 150 мл) на качалках со скоростью 180 об/мин. Были использованы следующие питательные среды: жидкая органическая среда №2 Гаузе, жидкая органическая среда №2 Гаузе с мелом, среда 6613, среда 330, среда «сахарозная», среда 2663, среда А4, среда 5339. Антибиотическую активность определяли в динамике на 3, 5, 7, 10 сутки роста, после осаждения мицелия вносили по 0,2 мл в лунки, проделанные в агаризованной среде № 2 Гаузе, предварительно засеянной тест-культурой. Через 24 часа определяли антибиотическую активность по диаметру зоны, на которой отсутствует рост тест-организма.

Изучение антагонистических свойств актиномицетов по отношению к тест-штаммам методом перпендикулярных штрихов



Актиномицет

Изучение антагонистических свойств актиномицетов по отношению к тест-штаммам методом диффузии в агар



Тест-штамм

Контрольные вопросы:

1. Что такое актиномицеты?
2. Каковы методы выявления антибиотической активности микроорганизмов?
3. В чем заключается метод перпендикулярных штрихов?
4. В чем заключается метод диффузии антибиотика в агар?
5. Как оценивают результат антагонистической активности?
6. Какие среды используют для культивирования актиномицетов?
7. Какова практическая значимость исследования антагонистических свойств актиномицетов?

Лабораторная работа №5

Тема: «Изучение бактерицидных свойств пенициллиновых антибиотиков в отношении грамположительных бактерий».

Цель работы: Определить бактерицидные свойства антибиотиков пенициллинового ряда в отношении грамположительных бактерий с использованием методов диффузии в агар и определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК).

Задачи:

1. Ознакомиться с механизмом действия пенициллинов.
2. Освоить методику диско-диффузионного теста.
3. Научиться определять минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).
4. Сравнить эффективность антибиотика на разных штаммах.

Краткая теория. Пенициллины (бета-лактамы) ингибируют синтез пептидогликана клеточной стенки, что приводит к лизису грамположительных бактерий. Бактерицидный эффект проявляется при концентрации выше МИК, когда клетка теряет осмотическую устойчивость. Для оценки активности используют метод диско-диффузии и метод серийных разведений.

Материалы и оборудование:

- Тест-штаммы: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*
- Питательные среды: МПА, МПБ.
- Антибиотические диски с пенициллином.
- Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

Методика выполнения:

1. Приготовить суспензию тест-культур (0,5 по МакФарланду).
2. Засеять равномерно поверхность МПА.
3. Нанести диски с антибиотиком.
4. Инкубировать при 37 °С 18–24 ч.
5. Измерить диаметр зон ингибиции.
6. Для МИК/МБК: приготовить ряд разведений антибиотика в МПБ, засеять, инкубировать, определить минимальную концентрацию.

Таблица результатов

Штамм	Диаметр зоны, мм	Интерпретация	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл	% ингибиции

Контрольные вопросы:

1. В чём отличие бактерицидного и бактериостатического действия антибиотиков?
2. Почему пенициллины более активны против грамположительных бактерий?
3. Что означает «0,5 по МакФарланду»?
4. Как определяется МБК?

Лабораторная работа №6

Тема: «Изучение бактерицидных свойств цефалоспориновых антибиотиков в отношении тест-штаммов».

Цель работы: Определить бактерицидную активность цефалоспориновых антибиотиков в отношении тест-штаммов микроорганизмов.

Задачи:

1. Ознакомиться с механизмом действия цефалоспоринов.
2. Изучить методы диско-диффузии и серийных разведений.
3. Сравнить активность антибиотиков разных поколений цефалоспоринов.
4. Сделать выводы об эффективности препаратов против выбранных штаммов.

Краткая теория. Цефалоспорины — бета-лактамы антибиотиков, сходные по механизму с пенициллинами, но более устойчивые к бета-лактамазам. Применяются против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для лабораторного исследования используют тест-штаммы: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

Материалы и оборудование:

- Тест-штаммы: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*.
- Питательные среды: Мюллер-Хинтон агар, Мюллер-Хинтон бульон.
- Диски с цефалоспорином (цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон).
- Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

Методика выполнения:

1. Приготовить суспензию культур.
2. Засеять поверхность МХА.
3. Разместить диски с антибиотиками.
4. Инкубировать при 37 °С 18–24 ч.
5. Измерить зоны ингибиции.
6. Для МИК/МБК: использовать метод серийных разведений в МХБ.
7. Сравнить показатели для разных штаммов.

Таблица результатов

Антибиотик	Штамм	Диаметр зоны, мм	Чувствительность	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл

Контрольные вопросы:

1. В чём отличие цефалоспоринов разных поколений?
2. Почему цефалоспорины устойчивее к действию бета-лактамаз?
3. Какие тест-штаммы применяют для контроля качества антибиотиков?
4. Какие методы применяют для определения МИК и МБК?

Лабораторная работа №7

Тема: «Методы изучения антимикробных свойств антибиотиков в отношении тест-штаммов. Метод бумажных дисков».

Цель работы: Освоить метод бумажных дисков для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и научиться интерпретировать результаты по диаметрам зон задержки роста.

Задачи:

1. Ознакомиться с принципом метода диффузии антибиотика в агар.
2. Научиться готовить тест-культуры для эксперимента.
3. Определить зоны ингибиции роста тест-штаммов.
4. Сравнить чувствительность различных штаммов к разным антибиотикам.

Краткая теория. Метод бумажных дисков (диско-диффузионный метод по Кирби–Бауэру) является стандартным для оценки чувствительности микроорганизмов. Принцип: антибиотик из бумажного диска диффундирует в агар, создавая градиент концентраций. Вокруг диска формируется зона задержки роста. Диаметр зоны обратно пропорционален устойчивости микроорганизма.

Материалы и оборудование:

- Тест-штаммы: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- Питательная среда: агар Мюллер–Хинтон.
- Бумажные диски с антибиотиками (пенициллин, ампициллин, цефтриаксон, гентамицин, ципрофлоксацин).
- Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.
- Стерильные пинцеты/аппликаторы.

Методика выполнения:

1. Приготовить суспензию бактерий (0,5 по МакФарланду).
2. Засеять равномерно поверхность МХА стерильным тампоном.
3. Разместить на поверхности чашки Петри бумажные диски с антибиотиками.
4. Инкубировать при 35–37 °С 18–24 ч.
5. Измерить диаметры зон задержки роста (в мм).

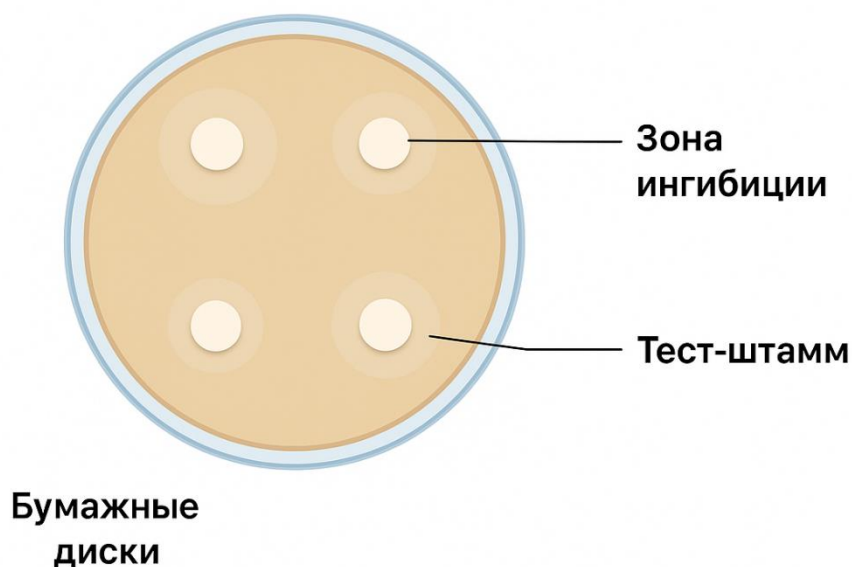
6. Сравнить результаты с таблицами критических значений (EUCAST/CLSI).

Таблица для результатов

Антибиотик	Штамм	Диаметр зоны, мм	Интерпретация (S/I/R)

Методы изучения антимикробных свойств антибиотиков в отношении тест-штаммов

Метод бумажных дисков



Контрольные вопросы:

1. В чём принцип метода бумажных дисков?
2. Почему важно использовать стандарт мутности 0,5 по МакФарланду?
3. Как диаметр зоны задержки роста связан с чувствительностью микроорганизма?
4. Какие ограничения у метода бумажных дисков?
5. Чем диско-диффузионный метод отличается от метода серийных разведений?

Пример интерпретации зон ингибиции (EUCAST/CLSI):

Примерные значения для некоторых антибиотиков в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* (значения могут отличаться в зависимости от стандарта и версии).

Антибиотик	Штамм	S (чувствит.) ≥, мм	I (промеж.) мм	R (устойчив.) ≤, мм
Пенициллин	<i>Staphylococcus aureus</i>	≥29	26–28	≤25
Ампициллин	<i>Escherichia coli</i>	≥17	14–16	≤13
Цефтриаксон	<i>Escherichia coli</i>	≥23	20–22	≤19

Лабораторная работа №8

Тема: «Изучение антагонистических свойств лактобацилл по отношению к тест-штаммам».

Цель работы: Определить антагонистическую активность лактобацилл в отношении тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с использованием микробиологических методов.

Задачи:

1. Ознакомиться с биологическими особенностями лактобацилл.
2. Освоить методы выявления антагонистической активности микроорганизмов.
3. Сравнить чувствительность различных тест-штаммов к лактобациллам.
4. Научиться оформлять результаты эксперимента.

Краткая теория. Лактобациллы (род *Lactobacillus*) являются представителями нормальной микрофлоры человека и животных. Они обладают выраженной антагонистической активностью за счёт:

- * продукции органических кислот (молочной, уксусной),
- * выделения перекиси водорода,
- * синтеза бактериоцинов.

Эти вещества угнетают рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Для оценки антагонизма применяются:

- * метод перпендикулярных штрихов,
- * метод «spot on lawn» (точечный посев на газон),
- * методы диско- и луночной диффузии,
- * использование клеточно-свободных супернатантов (КСС).

Материалы и оборудование:

- Культуры лактобацилл.
- Тест-штаммы (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и др.).
- Питательные среды: MRS-агар/бульон (для лактобацилл), агар Мюллера–Хинтона (для тест-штаммов).
- Стерильные бумажные диски или лунки.
- Пипетки, пинцеты, стерильные пробирки.
- Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.
- Инкубатор (30–37 °C).

Методика выполнения:

1. Приготовить суспензию тест-штаммов (0,5 по МакФарланду).
2. Засеять поверхность чашки Петри тест-штаммом методом газона.
3. Нанести суспензию лактобацилл или клеточно-свободный супернатант:
 - * методом дисков (пропитанные диски),
 - * методом лунок (залить в отверстия в агаре),
 - * точечным посевом («spot on lawn»).
4. Инкубировать 18–24 ч при 37 °C.
5. Измерить зоны ингибиции (в мм).

$$\% \text{ ингибиции} = \frac{OD_{\text{контроль}} - OD_{\text{опыт}}}{OD_{\text{контроль}}} \times 100\%$$

Таблица для результатов

Штамм лактобацилл	Тест-штамм	Метод	Диаметр зоны, мм	Интерпретация
Lb. plantarum	Escherichia coli	диски		
Lb. rhamnosus	Staphylococcus aureus	лунки		
Lb. casei	Enterococcus faecalis	spot on lawn		

Контрольные вопросы:

1. Какие вещества обеспечивают антагонистическую активность лактобацилл?
2. В чем принцип метода перпендикулярных штрихов?
3. Чем метод дисков отличается от метода лунок?
4. Как рассчитать % ингибиции?
5. Какие факторы могут влиять на результаты эксперимента?

Интерпретация результатов (S/I/R). Для оценки антагонистической активности лактобацилл можно использовать следующую шкалу:

Диаметр зоны ингибиции, мм	Интерпретация	Обозначение
≥ 15 мм	Чувствительный	S
10–14 мм	Промежуточный	I
≤ 9 мм или зона отсутствует	Устойчивый	R

Пример таблицы с результатами:

Штамм лактобацилл	Тест-штамм	Метод	Диаметр зоны, мм	Интерпретация
Lb. plantarum	Escherichia coli	диски	16	S (чувствительный)
Lb. rhamnosus	Staphylococcus aureus	лунки	12	I (промежуточный)
Lb. casei	Enterococcus faecalis	spot on lawn	8	R (устойчивый)

Меры безопасности!

- * Работать в перчатках и халате.
- * Использовать стерильные инструменты и материалы.
- * Утилизировать использованные чашки Петри и диски по правилам биобезопасности.