

TESTOVÁNÍ PROTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ LÁTEK

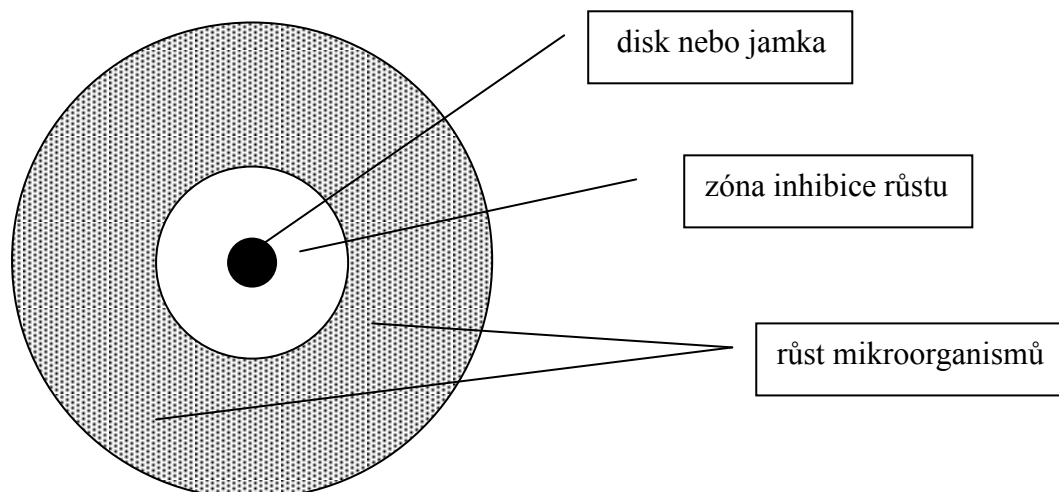
1. Úvod - dvojí význam testování

Protimikrobní účinnost je základní vlastností antibiotik, chemoterapeutik, desinfekčních látek, konzervačních prostředků i nejrůznějších ochranných přípravků. Je to jejich schopnost inhibovat (zastavovat) růst či množení mikroorganismů nebo působit odumírání jejich buněk. Značné množství takových látek je již řadu let používáno v klinické i veterinární medicíně, potravinářství, různých průmyslových odvětvích i při ochraně památek k zamezení působení nežádoucích mikroorganismů. Účinnost protimikrobních látek je výrazně závislá na jejich koncentraci, dále na podmínkách v nichž mají působit a na charakteru mikroorganismů, proti nimž mají působit. Je proto zřejmé, že bez důkladného testování není praktické využití takových látek možné.

Zcela odlišným smyslem testování je zkoumání biologických účinků nejrůznějších látek, materiálů, chemikálií či odpadů z pohledu jejich vlivu na životní prostředí - tedy tzv. testování ekotoxicity. Smyslem testů je zde postihnout možné negativní dopady látek, vypouštěných člověkem, na jednotlivé složky biosféry. Mikroorganismy jako testovací organismy mají při těchto testech některé výhody. Proti řasám, korýšům či kulturním rostlinám (které se rovněž používají pro sledování ekotoxicity) se snadno kultivují i uchovávají a rychle se množí; testy jsou proto časově nenáročné, levné a především postihují celý životní cyklus organismu.

2. Metody testování

Při testování protimikrobních účinků mají největší vypovídací schopnost takové metody, kde testovaná látka či materiál působí na rostoucí mikroorganismy, protože tak mohou být postiženy účinky na všechny životní děje. Běžnou metodou je při sledování konkrétních látek difusní test, který je prováděn v Petriho miskách a je založen na difuzi zkoumané látky naočkovaným agarovým živným médiem. Látka je aplikována buď ve formě roztoku do jamky v agarové půdě, nebo ve formě napuštěného papírového disku, položeného na povrch půdy. Pokud testovaná látka vykazuje protimikrobní efekt vůči použitému mikroorganismu, jeho růst ustává v určité vzdálenosti od jamky či disku a tak dochází po příslušné kultivaci k vytvoření kruhové inhibiční zóny, jak je znázorněno na následujícím obrázku.



Difusní metoda je použitelná pro sledování účinku vodorozpustných látek vůči bakteriím, kvasinkám i plísním. Při testování látek ve vodě nerozpustných je však difuze poněkud omezená a je nutno testy určitým způsobem modifikovat. V dnešní době je v rutinní mikrobiologické praxi difusní metoda používána nejvíce ke sledování citlivosti a resistance mikroorganismů k antibiotikům, přičemž jsou využívány továrně vyráběné standardní antibiotické disky.

Dalším významným způsobem testování je sledování růstu mikroorganismů v tekutých živných médiích, za přítomnosti protimikrobní látky. Růst je obvykle hodnocen tvorbou zákalu média nebo sedimentu a lze jej odečítat vizuálně nebo turbidimetricky (spektrofotometricky při 600 nm). Tato metoda je v mikrobiologii široce používána ke stanovení tzv. minimálních inhibičních koncentrací (MIC), tj. nejnižších koncentrací látek, které zcela zastaví růst testovacích mikroorganismů, a také minimálních mikrobicidních koncentrací (MMC), tj. nejnižších koncentrací látek, které dané mikroby usmrtí. Aplikace této metody spočívají především v posuzování účinnosti technických, potravinářských i farmaceutických látek s protimikrobním účinkem; navíc je tato metoda dobře použitelná i pro testování ekotoxicity.

Jiné metody testování protimikrobních účinků jsou již používány jen pro hodnocení ekotoxicity - jde např. o test sledování bioluminiscence, test inhibice respirace aktivovaného kalu nebo ATP-test založený na stanovení obsahu ATP v buňkách. Samostatnou kapitolou je Amesův test na bakteriích *Salmonella typhimurium*, který byl vypracován ke sledování mutagenity látek.

3. Laboratorní úkoly

Úkol č. 1: Testování účinnosti antibiotik nebo antimykotik vůči kulturám mikroorganismů diskovou metodou

- Připravte suspenzi testované kultury kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) v cca 2 ml fyziologického roztoku, hustotu nastavte na 2. stupeň McFarlandovy stupnice.
- Na každou Petriho misku se Sabouraudovým agarem (2 ks) napipetujte 200 µl suspence a dokonale rozetřete sterilní hokejkou po celé ploše. Proveďte krátké odsušení v laminárním boxu nebo opatrně v blízkosti kahanu.
- Na každou misku vložte 6 ks disků z přehledu uvedeného níže.
- Kultivujte dle nároků testované kultury min. 2 dny a vyhodnoťte tvorbu a velikost inhibičních zón (v milimetrech).
- Přehled použitých diagnostických disků:

AMB (AMFOTERICIN B)	FLU (FLUKONAZOL)
5.FC (5-FLUOROCYTOSIN)	ITR (ITRAKONAZOL)
KLO (KLOTRIMAZOL)	KET (KETAZOL)
MIK (MIKONAZOL)	NYS (NYSTATIN)
PIM (PIMARICIN)	EKO (EKONAZOL)
BIF (BIFONAZOL)	CIK (CIKLOPIROXOLAMIN)

Úkol č. 2: Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) 1-oktyl-2-pyrrolidonu metodou v mikrotitračních destičkách

- Připravte suspence testovacích kultur bakterií (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), každou v cca 2 ml fyziologického roztoku, hustotu nastavte na 2. stupeň McFarlandovy stupnice.
- Do označených jamek napipetujte po 180 µl připravených TSB bujonů s koncentrací 1-oktyl-2-pyrrolidonu 0 – 50 – 100 – 175 – 250 – 375 – 500 – 1000 mg/l.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0				0	0	0			0
B	50	50	50				50	50	50			50
C	100	100	100				100	100	100			100
D	175	175	175				175	175	175			175
E	250	250	250				250	250	250			250
F	375	375	375				375	375	375			375
G	500	500	500				500	500	500			500
H	1000	1000	1000				1000	1000	1000			1000

- c) Každou jamku sloupců 1, 2 a 3 naočkejte 20 μ l jedné kultury a každou jamku sloupců 7, 8 a 9 naočkejte 20 μ l druhé kultury, dle zadání učitele. Sloupec 12 je neočkovaná kontrola, tam napipetujte do každé jamky 20 μ l sterilního fyziologického roztoku.
- d) Inkubace proveďte 2 – 3 dny při teplotě 37°C a poté hodnotte růst či inhibici růstu testovacích bakterií. Ze získaných výsledků stanovte minimální inhibiční koncentraci (MIC) 1-oktyl-2-pyrrolidonu pro jednotlivé druhy testovacích bakterií.