



Πολυτεχνείο Κρήτης- Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, 2^ο Εξάμηνο

10
Fe

Ομάδα 15

5^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Ημερομηνία : 08 Μάη 2018

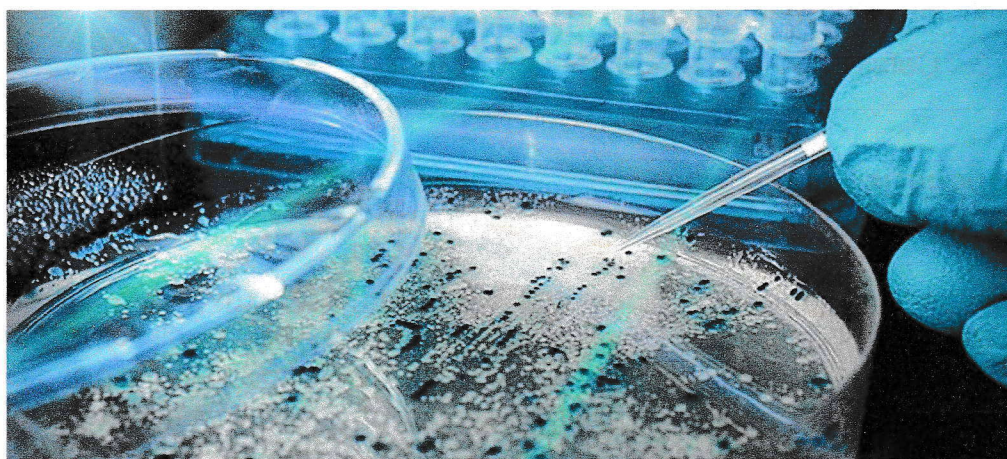
Μέλη: Ευαγγέλου Παναγιώτης

Αυξεντίου Λουκής

Ολύμπιος Πέτρος

Χατζηθανασίου Χρύσω

Κανναβιάς Χρύσανθος



Εισαγωγή

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι ο έλεγχος ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε ποικιλία αντιβιοτικών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος της διάχυσης των αντιβιοτικών στο αγάρ, μια από της πιο χρήσιμες και πλέον διαδεδομένες μεθόδους στην μικροβιολογία. Αρχίζοντας, προετοιμάζουμε τα κατάλληλα εναιωρήματα μικροοργανισμών, τα οποία ενσωματώνονται ή εμβολιάζονται στην επιφάνεια του καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού. Ακολούθως, προστίθενται τα αντιβιοτικά με τη μορφή διαλύματος σε βύθισμα στο αγάρ ή σε μικρούς κυλίνδρους ο οποίοι τοποθετούνται στην επιφάνεια του αγάρ.

Υλικά-Μέθοδοι

- Mueller Hinton II Agar: 38g Mueller Hinton II Agar σε 1L ddH₂O.
Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.
- Χλωριούχο Νάτριο (0.9%)
- Αντιβιοτικά υπό μορφή δίσκων στις παρακάτω αναγραφόμενες συγκεντρώσεις:
 1. Amikacin 30μg
 2. Streptomycin 10 μg
 3. Cefaklor 30 μg

Πειραματική Διαδικασία:

Για τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο υγρές καλλιέργειες βακτηρίων, Εντερόκοκκων και *Escherichia coli*, οι οποίες μας δόθηκαν έτοιμες. Στη συνέχεια, με την χρήση βαμβανοφόρων στυλέων, διασπείραμε τις καλλιέργειές μας σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Ακολούθως τοποθετήσαμε μέσα στα τρυβλία τα τρία διαφορετικά δισκία αντιβιοτικών και τα αφήσαμε να επωασθούν στους 37°C για μια μέρα. Τέλος, μετά το αναγκαίο χρονικό διάστημα επώασης, μελετήσαμε τα τρυβλία και τις ζώνες αναστολής των αντιβιοτικών.

Πειραματικά Αποτελέσματα:

Μετά την μελέτη των τρυβλίων, παρατηρήσαμε πως το σχήμα των ζωνών αναστολής αντιβιοτικών είναι κυκλικό και μετρήσαμε την διάμετρο τους.

Στο τρυβλίο του εντερόκοκκου η διάμετρος της Στρεπτομυκίνης (S10) ήταν 23 mm, της Αμικασίνης (AK30) 25 mm και της Κεφακλόρης (CF30) 7 mm.

Στο τρυβλίο του E.Coli η διάμετρος της Στρεπτομυκίνης (S10) ήταν 10 mm, της Αμικασίνης (AK30) 15 mm και Κεφακλόρης (CF30) 20 mm.

Η διάμετρος της ζώνης αναστολής για τα επιμέρους αντιβιοτικά μεταφράζεται σε τρεις κατηγορίες ευαισθησίας του μικροβίου: ευαίσθητο, ενδιάμεσο, ανθεκτικό.

Αντιβιοτικά	Περιεκτικότητα δισκίου	Διάμετρος της ζώνης αναστολής (mm)		
		Ανθεκτικό	Μετρίως ευαίσθητο	Ευαίσθητο
Αμικασίνη (AK30)	30 μ g	≤ 14		≥ 17
Στρεπτομυκίνη (S10)	10 μ g	≤ 11		≥ 15
Σεφακλόρ (CF30)	30 μ g	≤ 14		≥ 18

Συζήτηση

Αρχίζοντας, πρέπει να αναφέρουμε ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος της ζώνης αναστολής τόσο πιο μικρή είναι και η ανθεκτικότητα του βακτηρίου με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Από τα πιο πάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το πιο δραστικό αντιβιοτικό ως προς την καλλιέργεια της *E.coli* είναι η κεφακλόρη καθώς έχει τη μεγαλύτερη διάμετρο ζώνης αναστολής. Ακολουθεί η αμικασίνη ενώ η στρεπτομυκίνη είναι η λιγότερο δραστική. Παράλληλα, ως προς την καλλιέργεια του *Εντερόκοκκου* παρατηρούμε ότι το πιο δραστικό αντιβιοτικό είναι η αμικασίνη ενώ εξίσου δραστική είναι και η στρεπτομυκίνη αλλά με μικρότερη διάμετρο ζώνης αναστολής. Τέλος το λιγότερο δραστικό αντιβιοτικό παρατηρούμε πως είναι η κεφακλόρη.

Έχοντας παρατηρήσει τη δραστηριότητα των αντιβιοτικών και στις δύο καλλιέργειες, μπορούμε εξηγήσουμε αυτά τα αποτελέσματα ανατρέχοντας στην προέλευση αυτού του αντιβιοτικού.

Η αμικασίνη όντας αντιβιοτικό της ομάδας των ημισυνθετικών αμινογλυκοσίδων, προέρχεται από τη καναμυκίνη, ουσία η οποία είναι αποτελεσματική τόσο έναντι Gram (+) μικροοργανισμών όπως ο *Εντερόκοκκος* όσο και έναντι μικροοργανισμών Gram(-) όπως η *E.coli*. Η αμικασίνη, όπως και η στρεπτομυκίνη, αποτελεί αναστολέα πρωτεϊνικής σύνθεσης. Συνδέεται μη αναστρέψιμα με το 16S rRNA και τη πρωτεΐνη S12 ενώ ταυτόχρονα δεσμεύεται με την υπομονάδα 30S του προκαρυωτικού ριβοσώματος και αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών, μεταβάλλοντας το σχήμα του ριβοσώματος έτσι ώστε να μην μπορεί να διαβάσει σωστά τα κωδικόνια του mRNA, σκοτώνοντας έτσι το βακτήριο.

1) Στην ίδια κατηγορία αντιβιοτικών συγκαταλέγεται και η στρεπτομυκίνη η οποία συνδέεται με το 16S rRNA της υπομονάδας 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, παρεμβαίνοντας στη δέσμευση του φορμυλ-μεθειονυλο-tRNA στην υπομονάδα 30S. Αυτό οδηγεί σε εσφαλμένη ανάγνωση κωδικονίου, ενδεχόμενη αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και τελικά θάνατο μικροβιακών κυττάρων. Η διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ της αμικασίνης και της στρεπτομυκίνης εξηγείται από τη τροποποίηση των ριβοσωμάτων, δηλαδή μετάλλαξη των γονιδίων των βακτηρίων κατά την οποία μεταβάλλεται η ριβοσωμική πρωτεΐνη S12 με αποτέλεσμα την αντοχή κάποιων βακτηρίων στη στρεπτομυκίνη.

Τέλος η κεφακλόρη είναι αντιβιοτικό το οποίο ανήκει στην ομάδα των ημισυνθετικών κεφαλοσπορίνων δευτέρας γενιάς της οποίας η βακτηριοκτόνος δράση οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Πιθανότατα για αυτό το λόγο είναι λιγότερο δραστική ενάντια στο βακτήριο του Εντερόκοκκου, βακτήριο το οποίο είναι Gram(+) με περισσότερα κυτταρικά τοιχώματα και τοιχωικά οξέα, ενώ είναι πολύ δραστικό ενάντια στο βακτήριο της E.coli, βακτήριο το οποίο είναι Gram(-) με ένα έως δύο κυτταρικά τοιχώματα.

Βιβλιογραφία

- 1) U.S.National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information