

Тема: Питательные среды. Классификация питательных сред. Методы посева и культивирования бактерий.



План:

- Классификация, требования, этапы приготовления, хранение.
- Контроль качества питательных сред.

- При исследовании разнообразных свойств микроорганизмов, а так же для диагностики инфекционных заболеваний, обычно приходится прибегать к выращиванию микроорганизмов на искусственных питательных средах. Питательные среды являются основой микробиологической работы. Чтобы микроорганизмы могли интенсивно размножаться на такой среде, она должна соответствовать определенным требованиям:
 1. *Содержать достаточное количество питательных веществ, быть питательной т.е содержать в легко усвоенном виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергических потребностей.*

Нередко в питательные среды вносят факторы роста – vit , некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.

Необходимо помнить, что микроорганизмы как и все микроорганизмы нуждаются в большом количестве воды.

- 2. Иметь оптимальную концентрацию водородных ионов – рН, т.к. это сказывается на проницаемость оболочки, благодаря чему микроорганизмы могут усваивать питательные вещества .

Для большинства патогенных бактерий оптимальной средой является слабощелочная (рН 7,2 – 7,4).

Исключением является холерный вибрион, его оптимальное нахождение в щелочной среде (рН 8,5 – 9,0). И возбудитель тbc, грибы слабокислая среда (рН 6,2 – 6,8)

Питательные среды должны содержать вещества, которые нейтрализуют продукты обмена микроорганизмов, это необходимо для того, чтобы не менялось рН питательной среды.

3. Осмотическое давление в среде должны быть так же, как внутри клетки т.е. Быть изотоничным для большинства микроорганизмов составляет 0,5% р-ру NaCl.
4. Стерильность и малейшая погрешность в этом отношении может сделать среду не пригодной, препятствующий росту изучению микроорганизма. Определения его свойств и изменяющие свойства среды. (состав, рН и др.)

- 5. Плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную консистенцию.
- 6. Обладать определенным окислительно – восстановительным потенциалом, т.е. соотношением веществ отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 - он показывает насыщение среды кислородом.

Мы знаем, что микроорганизмы подразделяются на, аэробы и анаэробы .

- 7. Среда должна быть унифицированной, т.е. содержать постоянные количества отдающих ингредиентов. Одним из желательных требований к средам: прозрачность, т.к. удобнее следить за ростом культуры.

Классификация сред

- Поскольку потребность у разных видов микроорганизмов в питательных веществах неодинакова, то и создание универсальной среды практически не возможно.

Предложено очень большое количество сред, в основе классификаций которых положены следующие признаки:

1. По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды.

Натуральные среды - готовят из продуктов животного и растительного происхождения.

- **Синтетические** – готовят из органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растительных в дважды дистиллированной воде. И поэтому они имеют преимущество, в том что их состав постоянен, известно сколько и какие вещества в них входят, поэтому их легко произвести.
- 2. Консистенция (степень плотности)
- Среды делятся на: *жидкие, плотные, полужидкие*. Плотность достигается за счет добавления агар – агара или желатина, полисахарид получают из определенных сортов морских водорослей. Каких либо питательных веществ для микроорганизмов он не содержит и служит только для уплотнения сред.

- **Желатин** - белок животного происхождения поэтому некоторые микроорганизмы используют его как питательные вещества при их росте среда разжижается.
- Свернутая сыворотка крови, свернутые яйца, картофель, так же используются в качестве плотной сред.

• 3. По составу

простые

МПБ, МПА, бульон,
агар Хоттингера,
желатин, пептон,
H₂O.

сложные

простые среды +
кровь, сыворотка,
углеводы и др.

- **4. Назначение:**
- А) основные они служат для культивирования большинства патогенных микробов. К ним относят: МПБ, МПА, бульон и агар, пептонная вода.
- Б) Специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не расщепляющих на простых средах.
- **Например:** добавляя сахар к среде способствует росту стрептококков.
- В) селективные (избирательные) само название говорит за себя т.е. благоприятствующий росту определенного вида, подавляющий рост других. Жидкие селективные среды называются средами **накопления.**

- *Г) дифференциально – диагностические среды* позволяют отличить один вид микроба от другого по ферментативной активности
- *Д) консервирующие среды* предназначены для первичного посева и транспортировке исследования материала.
- **Например:** глицериновая смесь используется для сбора испражнений при исследовании, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.
- *Сухие среды* - это порошки во флаконах с завинчивающимися крышками выпускаемые нашей промышленностью.

- **Преимущество сухих сред** - стандартность (их выпускают большими партиями), простота приготовления (готовятся по прописи на этикетках) стабильная возможность приготовления в любых условиях.



Этапы приготовления питательных сред

- *1. Варка.*

Варят среды на открытом огне, водяной бане, в автоклаве.

- *2. Установление оптимальной величины.*

РН, с помощью индикаторных бумажек. Для более точного определения рН использует потенциометр или компаратором (аппарат Михаэлиса)

- *3. Осветление* в подогретую среду до 50С вливают куриный белок предварительно взбитый с двойным количеством воды. Или сыворотку крови (20-30мл. на 1л. Среда) кипятят, свертываясь белки увлекают в осадок взвешенные в среде частицы.

- 4. *Фильтрацию* осуществляют через фильтр бумажный или матерчатый.

Фильтрацию агаровых сред (т.к. быстро застывают) заменяют отстаиванием в автоклаве.

- 5. *Разливают* в пробирки (по 3 – 5 мл. 10мл.) флаконы, колбы, бутылки не более чем на 2/3 емкости.

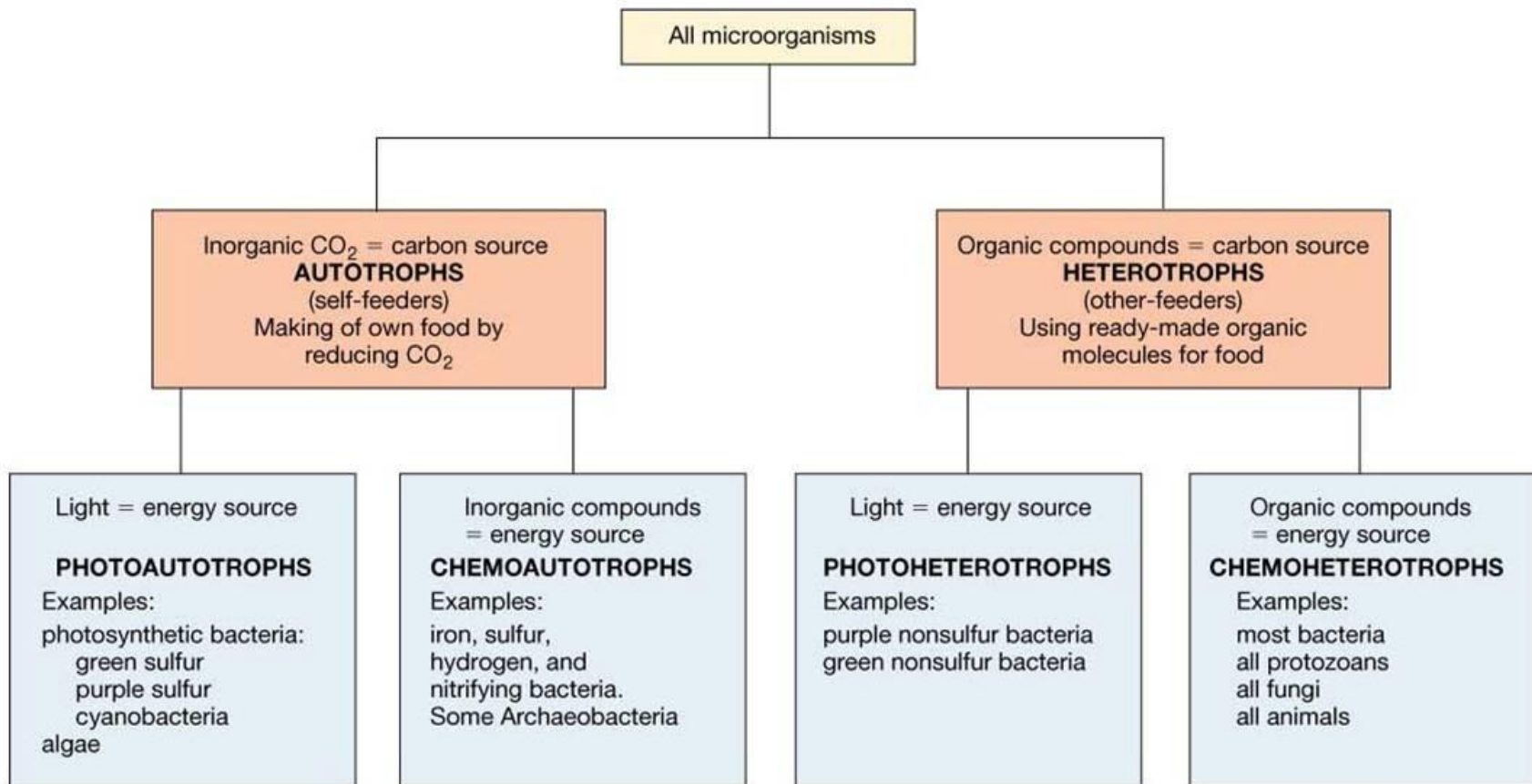
Среды которые стерилизуют при t выше 100°C наливают в чистую посуду. Закрывают ватно – марлевыми пробками поверх которых надевают бумажные колпачки. Прикрепляют этикетку с названием среды и датой ее приготовления.

- 6. *Стерилизация*. Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в ее рецепте.

- *7. Контроль* осуществляется на стерильность среды (в термостате на 2 суток, после чего смотрят не появились ли признаки роста) затем передают в хим. Лабораторию на хим. Контроль . Устанавливается рН, содержания общего и аминного азота, хлоридов, все должно соответствовать количеству указанному в рецепте.

Для биологического контроля засевают специально подобранными культурами микроорганизмов, по их росту о питательных свойствах среды. К готовой среде приклеивают этикетку и паспорт, в котором указывают название и состав среды. Результаты контроля хранят при комнатной t в шкафах.

Классификация микроорганизмов по источнику углерода



Способы существования прокариотных микроорганизмов
(по Заварзину, 1974; Е. Н. Кондратьевой, 1975)

Источник энергии	Доноры электронов	Конечные акцепторы электронов	Источник углерода для построения вещества тела	Способ существования	Представители
Окислительно-восстановительные реакции	неорганические соединения (H ₂ , H ₂ S, NH ₃ , Fe ²⁺ и др.)	молекулярный кислород	CO ₂	хемотрито-аэроавтотрофия	нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии
			органические соединения	хемотритоаэрогетеротрофия	некоторые водородные и железобактерии
		CO ₂ , SO ₄ ²⁻	CO ₂	хемотритоанаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии
			органические соединения	хемотритоанаэрогетеротрофия	сульфатвосстанавливающие бактерии
	органические соединения	молекулярный кислород	CO ₂	хемотритоанаэроавтотрофия	окисление муравьиной кислоты бактериями
			органические соединения	хемотритоанаэрогетеротрофия	большинство бактерий*
		органические соединения	CO ₂	хемотритоанаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии
			органические соединения	хемотритоанаэрогетеротрофия	молочнокислые, маслянокислые и другие бактерии, осуществляющие брожение
Свет	неорганические соединения (H ₂ O, H ₂ S, S и др.)	—	CO ₂	фотолитоавтотрофия	цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий, некоторые несерные пурпурные бактерии**
			органические соединения	фотолитогетеротрофия	некоторые цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий
	органические соединения	—	CO ₂	фотоорганавтотрофия	некоторые пурпурные бактерии
			органические соединения	фотоорганогетеротрофия	все несерные пурпурные бактерии, некоторые пурпурные и зеленые серобактерии, галобактерии

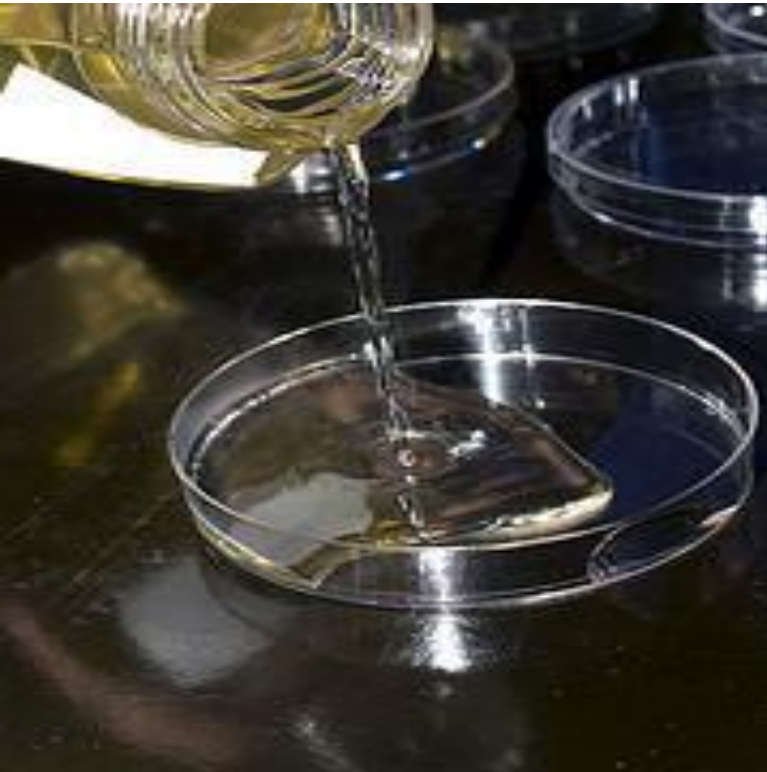
* Все животные, грибы.

Классификация питательных сред

Питательные среды делят *по консистенции, составу, назначению.*

- В зависимости от *консистенции* различают жидкие (мясопептонный бульон, сахарный бульон), плотные (1-2% мясопептонный агар, свернутая сыворотка), полужидкие (0, 2-0, 5% мясопептонный агар) питательные среды. Для получения П. с. плотной консистенции к жидкой среде добавляют обычно агар-агар - полисахарид, добываемый из морских водорослей, или желатин - вещество белковой природы животного происхождения.
- *По составу среды* могут быть простыми и сложными
- В зависимости от *назначения* выделяют элективные, среды обогащения, дифференциально-диагностические.

Простые(универсальные, основные) питательные среды



- мясо-пептонный бульон (**МПБ**) — жидкая среда
- мясо-пептонный агар (**МПА**) — плотная среда
- ❖ Обеспечивают рост большинства бактерий
- ❖ Служат основой для приготовления сложных сред

Сложные среды с повышенной питательной ценностью



- Обогащенные углеводами (сахарный бульон/агар)
- Обогащенные белками (кровяной, сывороточный, асцит бульон/агар)

- Рост гноеродного стрептококка на кровяном агаре(вокруг колоний видны зоны гемолиза)

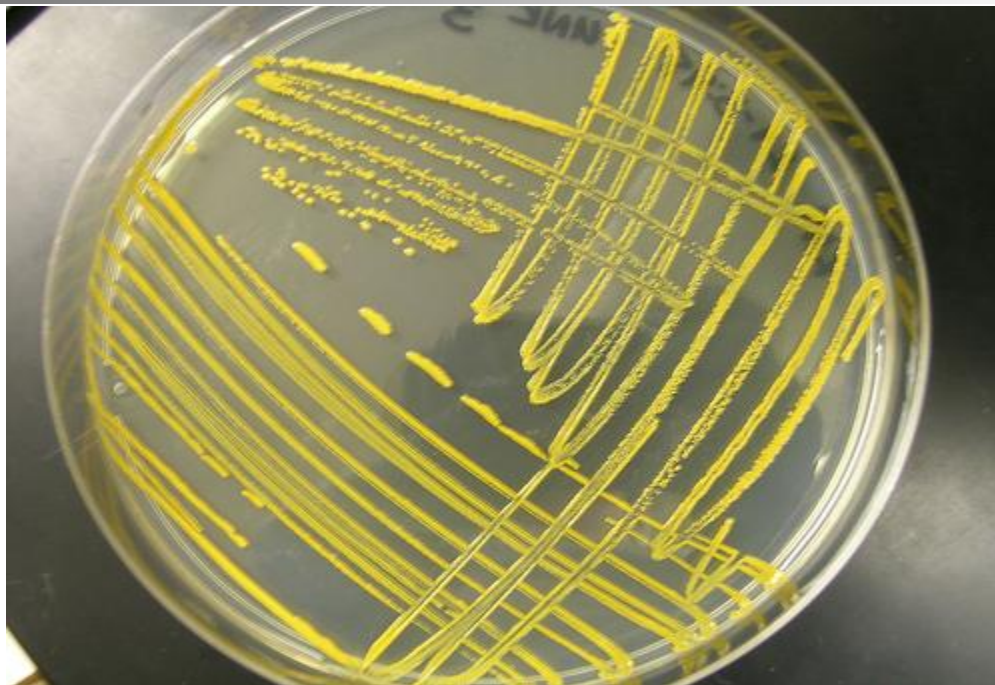
Элективныe (избирательные) питательные среды

- Обеспечивают преимущественный рост определенной группы бактерий



- *Среда Леффлера*
(свернутая сыворотка крови с сахарным бульоном) - эффективна для дифтерийной палочки

Элективные (избирательные) питательные среды (продолжение)



- *Щелочной агар*
для холерного
вибриона

- *Желточно-солевой агар*
для *S. aureus*

Элективные (избирательные) питательные среды (продолжение)



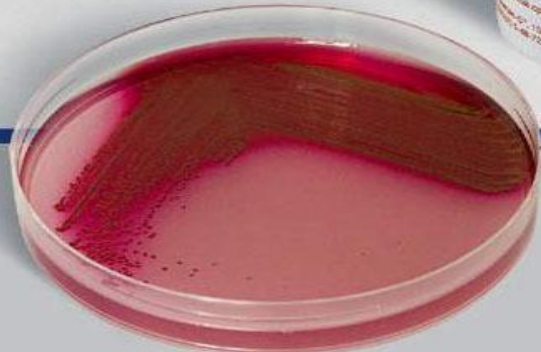
Агар Сабуро
для обнаружения
дрожжей и
плесневых грибов

Дифференциально-диагностические среды



- Позволяют дифференцировать группы или виды бактерий по ферментативной активности
- *Среды Эндо, Левина, Плоскирева* – используются для выделения чистой культуры энтеробактерий на 1 этапе; позволяют дифференцировать бактерии, способные и неспособные ферментировать лактозу
- *Среды Гисса* – используются на 3 этапе выделения чистой культуры для определения спектра сахаролитической активности.

Среда Эндо



E. coli

ферментирует
лактозу



Salmonella* и *Shigella

не способны
ферментировать
лактозу

- ❖ **Состав:** мясопептонный агар, лактоза, фуксин, сульфит натрия (Na_2SO_3),
- ❖ Принцип действия: фуксин обесцвечивается сульфитом натрия (образуется бесцветная фуксинсернистая кислота);
- ❖ Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами на альдегиды, в том числе и с фуксинсернистой кислотой с образованием свободного фуксина, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него.
- ❖ Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).

Среда Плоскирева



- ❖ селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл.
- ❖ В состав среды Плоскирева входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протей.
- ❖ Дифференцирующие свойства агара Плоскирева основаны на изменении рН в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют колонии брусничного цвета (индикатор нейтральный красный).
- ❖ Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабоокрашенных колоний.

Среды Гисса :

- Состав: МПА, набор углеводов, индикатор
- Принцип действия: при ферментации углевода образующиеся кислые продукты меняют рН, при этом изменяется окраска индикатора



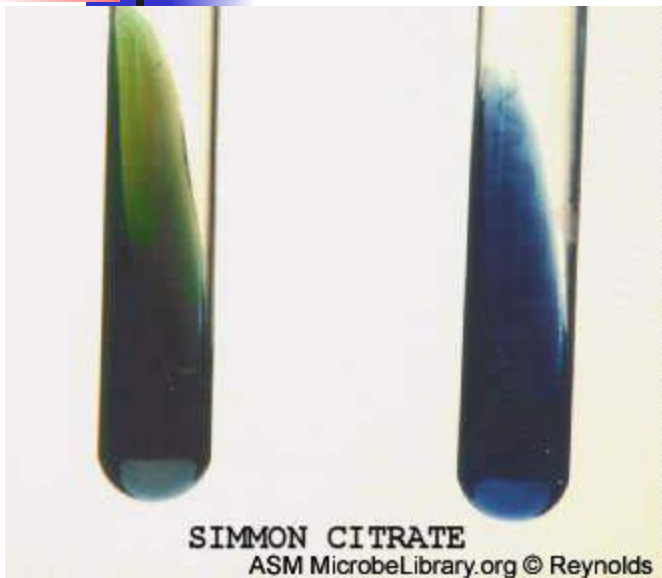
Среда Клиггера:

Содержит 1% лактозу, 0.1% глюкозу, тиосульфат натрия и сульфат железа, индикатор фенол рот. Посев по поверхности и уколом в столбик агара. При ферментации только глюкозы – желтый столбик, скошенная часть не меняет окраску. При ферментации и глюкозы, и лактозы (E.coli) – весь агар желтый. При образовании сероводорода (сальмонеллы, протей) – агар чернеет

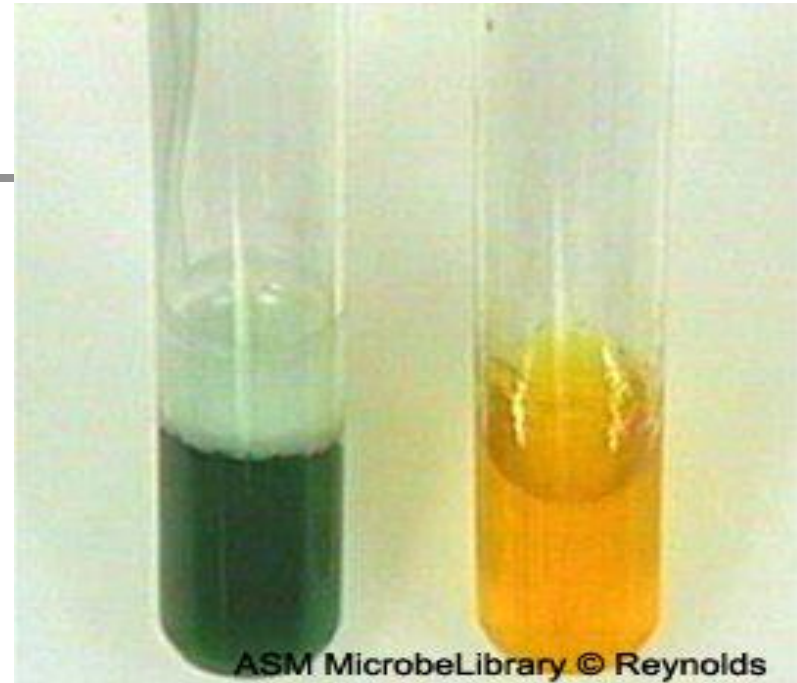


ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain

Дифференциально-диагностические среды (продолжение)



Среда Симмонса для определения способности микроорганизмов утилизировать цитраты



Окислительно-ферментативные среды для определения типа дыхания бактерий

- 
- Выделение отдельных видов бактерий из исследуемого материала, содержащего, как правило, смесь различных микроорганизмов, является одним из этапов любого бактериологического исследования, проводимого с различными целями: диагностики заболеваний, определения микробной обсемененности окружающей среды и т.д.
 - Для выделения чистой культуры применяют методы, основанные на:
 - ❖ 1) механическом разобщении бактериальных клеток (см. метод Дригальского);
 - ❖ 2) предварительной обработке исследуемого материала с помощью физических или химических факторов, оказывающих избирательное антибактериальное действие;
 - ❖ 3) избирательном подавлении размножения сопутствующей микрофлоры физическими или химическими факторами во время инкубации посевов;
 - ❖ 4) способности некоторых бактерий быстро размножаться в организме чувствительных к ним лабораторных животных (биопробы)



Определение числа бактерий

- *Общее число* клеток определяется а) путем подсчета клеток под микроскопом в окрашенном мазке б) по бактериальному стандарту (набор эталонов для определения концентрации бактериальных клеток в микробной взвеси по ее мутности; представляет собой запаянные пробирки, содержащие водную взвесь мелких частиц стекла пирекс).
- *Число живых клеток* определяется по числу колоний, образуемых жизнеспособными клетками