



Питательные среды

ВЫПОЛНИЛИ:

КОНЬКОВА А.В., МАСЛЯКОВА Т.А., ПЛЮСНИН Д.Ф.

План:

1. История
2. Классификация
3. Требования к питательным средам
4. Свойства и консистенция питательных сред
5. Приготовление
6. Стерилизация
7. Хранение

История появления питательных сред

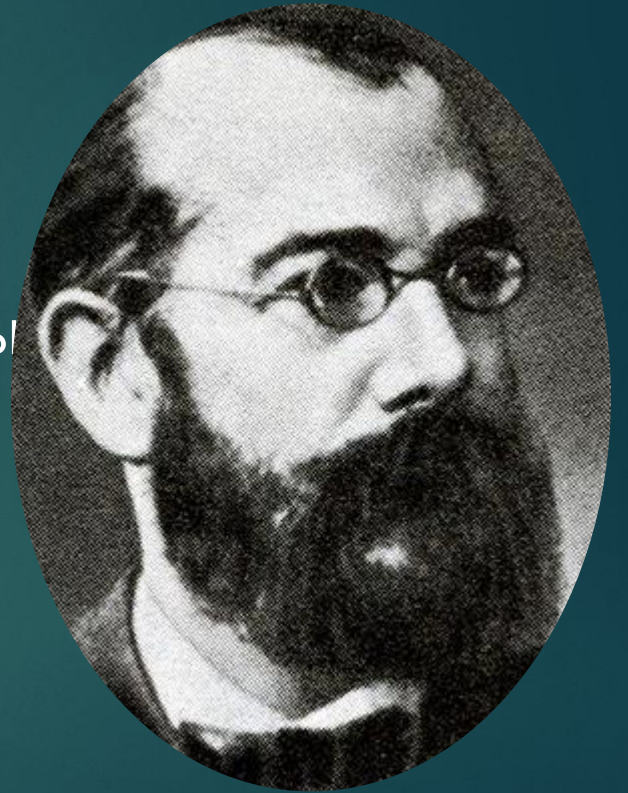
Питательная среда – это смесь веществ предназначенных для выращивания микроорганизмов в искусственных, лабораторных условиях.

История открытия питательных сред начинается с Л. Пастера. В 19 веке он положил начало культивированию в жидких средах.



История питательных сред имеет многовековой опыт. Начинается она с открытия Л. Пастера в 19 веке.

- ▶ В 1861 году он доказал, что брожение есть процесс, тесно связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибов, которые питаются и размножаются за счёт бродящей жидкости, т.е. положил начало культивированию в жидких средах.
- ▶ В 1883 году Р. Кох разработал метод выделения чистых культур микробов путем посева на пластинки желатина. Другой состав плотной среды, который используется до сих пор, предложил в 1884 году немецкий микробиолог В. Хессе. Основным компонентом был агар-агар, который его жена использовала для приготовления фруктового желе.



Осталось только найти форму, в которую удобно заливать плотные среды, и наблюдать за ростом микробов.

- ▶ Такая форма в виде донышка, отрезанного от лабораторной бутылки, была предложена в 1887 году Ю. Петри и получила название - чашка Петри.

Эти открытия положили основу для разработки, а затем промышленного выпуска и широкого практического использования жидких, полужидких и плотных питательных сред, которые, так же как и чашки Петри, до сих пор являются неотъемлемым атрибутом каждой микробиологической лаборатории.

- ▶ В 1905 году бактериолог А. Мак-Конки разработал первую хромогенную среду. В ее состав входят селективные компоненты (нейтральный красный и соли желчных кислот), которые ингибируют рост грам-положительных микробов, и специфический субстрат – лактоза. Кишечные бактерии ферментируют лактозу, что приводит к понижению pH и изменению окраски pH-индикатора. В результате колонии сальмонелл, шигелл и колиформных бактерий имеют красный цвет и окружены мутной зоной преципитации желчных солей.



В. Хессе



Э. Петри



Классификация питательных сред

- ▶ По исходным компонентам:
 - ▶ Натуральные среды (продукты живот. и раст. происх.)
 - ▶ **искусственные**
 - ▶ Синтетические среды
- ▶ По степени готовности:
 - ▶ Готовые среды
 - ▶ Сухие смеси
- ▶ По консистенции:
 - ▶ Жидкие
 - ▶ Полужидкие
 - ▶ Плотные
- ▶ По составу (простые и сложные)
- ▶ По назначению:
 - ▶ Основные (для культивирования больш. орган-в.)
 - ▶ Специальные (выделение и выращивание)
 - ▶ Элективные (выделение определ-х видов микробов)
 - ▶ Дифференциально диагностические
- ▶ Транспортные

► **По исходным компонентам:**

- Натуральные среды — готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, асцит, костная мука, кормовые дрожжи, сгустки крови и др.)

- Искусственные среды - содержат переработанные естественные продукты (мясную воду, перевар), вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты) и различные добавки. Это наиболее применяемая группа сред. Их готовят по определенным рецептам из различных настоев или отваров животного или растительного происхождения с добавлением неорганических солей, углеводов и азотистых веществ.

- Синтетические среды — готовят из определённых химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворённых в дважды дистиллированной воде.

► **По степени готовности:**

- Готовые питательные среды (в чашках Петри, во флаконах)

- Сухие смеси.

Это высушенные и измельченные до порошкообразного состояния готовые питательные среды. У сухих сред имеется ряд преимуществ перед средами обычного изготовления: их можно хранить длительно в сухом затемненном помещении в герметически закрытой таре, они транспортабельны, удобны в применении и стандартны, что облегчает получение сравнимых результатов при бактериологическом исследовании. Источник:

► По консистенции (степени плотности):

- Жидкие (бульоны)
- Полужидкие
- Плотные

Плотные и полужидкие среды отличаются от жидких наличием желеобразующего агента (агар-агар, реже желатин). Кроме того, в качестве плотных сред применяют коагулировавшие яичные или сывороточные белки, картофель, среды с силикагелем. *Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.*

► По составу:

- Простые: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), питательный желатин.
- Сложные — многокомпонентные среды, которые могут содержать аминокислоты, витамины, микроэлементы и другие вещества.

► По назначению:

- Основные — служат для культивирования большинства микроорганизмов, например МПБ, МПА, бульон, шоколадный агар, пептонная вода.
- Специальные — служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.
- Элективные (избирательные) — служат для выделения определённого вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится элективной при добавлении к ней определённых антибиотиков, солей, изменения pH. Жидкие элективные среды называют средами *накопления*.
- Дифференциально-диагностические — применяют для изучения биохимических свойств и отличия (дифференцировки) одного вида микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности.
- Транспортные — предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

В микробиологии питательные среды разделяют на:

- среды определенного и неопределенного состава;
- натуральные, полусинтетические и синтетические;
- основные, диагностические, элективные;
- плотные, полужидкие, жидкие, сухие, сыпучие.

Натуральными питательными средами называют те, что получают из природных материалов: крови, мяса, белков, органов животных, растительных экстрактов и растительного сырья. Примером таких сред могут быть мясной бульон, молочная сыворотка, пивное сусло, настои сена, агар-агар, кровь, желчь. Натуральные среды относятся к средам с неопределенным составом, который в разное время могут иметь разное количество тех или иных компонентов.

Полусинтетические среды тоже считаются средами с неопределенным составом. Они готовятся на основе натуральных питательных сред, но в них добавляются вещества, которые гарантируют культурам активное размножение. На полусинтетических средах выращивают культуры для получения витаминов, аминокислот, антибиотиков в промышленной фармацевтике.



Синтетические среды готовят из ингредиентов известного состава, в известной концентрации и соотношениях, поэтому эти среды относятся к средам определенного состава. С их помощью изучают метаболизм микроорганизмов, их биологические и физиологические свойства, возможность получения веществ, подавляющих или, наоборот, стимулирующих их развитие.

Основные, элективные и диагностические питательные среды

Основные среды служат для выращивания различных микробных культур, а также как основа для получения элективных и диагностических сред. К основным средам, например, относится мясной бульон, мясной агар, сусло, бульон Хоттингера. Для разных культур в основные среды добавляют некоторые компоненты для стимулирования роста — это могут быть витамины, аминокислоты, природные экстракты. Так, возбудитель коклюша выращивается на среде с добавлением крови.

Элективные среды — среды для избирательного (селективного) выращивания биологических культур. Состав среды подбирается так, чтобы быть оптимальным для одного вида или группы близкородственных бактерий и подавлять развитие бактерий других видов.

Например, добавление в среду хлористого натрия в определенной концентрации подавляет рост всех бактерий, кроме стафилококков. С помощью элективных культур получают чистые культуры для дальнейшего размножения и накопления.

Диагностические среды служат для идентификации микроорганизмов. По изменению среды и ее химического состава (изменению окраски среды, появлению пузырьков газа и т.п.) определяют вид бактерий. В такие среды часто добавляют химические красители-индикаторы, такие как кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый, метиленовый синий, фусин и другие. Они помогают разделить близкие культуры. Скажем, в розовой среде Эндо, подкрашенной фусином, кишечная палочка образует колонии красного цвета, а тифозные и дизентерийные колонии бактерий — бесцветные.



Нет роста
Enterococcus faecalis



Есть рост
Enterococcus faecalis



Требования к питательным средам

Питательные среды должны :

- ▶ быть **питательными**, то есть содержать в легко усваиваемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят *факторы роста* — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.
- ▶ иметь **оптимальную** концентрацию водородных ионов — pH, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2—7,4). Исключение составляют холерный вибрион — его оптимум находится в щелочной зоне (pH 8,5—9,0) и возбудитель туберкулёза, нуждающийся в слабокислой реакции (pH 6,2—6,8). Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили pH, среды должны обладать *буферностью*, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.

- ▶ быть **изотоничными** для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида.
- ▶ быть **стерильными**, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды.
- ▶ плотные среды должны быть **влажными** и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию.
- ▶ обладать определённым **окислительно-восстановительным** потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы — при RH_2 не ниже 10.
- ▶ быть по возможности **унифицированным**, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов.



Желательно, чтобы среды были *прозрачными* —
удобнее следить за ростом культур, легче
заметить загрязнение среды посторонними
микроорганизмами.

Свойства и консистенция питательных сред

Свойства:

- ▶ содержать достаточное количество питательных веществ, микроэлементов, минеральных солей;
- ▶ иметь определенную вязкость;
- ▶ иметь определенные влажность и/или кислотность;
- ▶ быть изотонической, не нарушать нормальное функционирование клеток, проницаемость клеточных мембран;
- ▶ в большинстве случаев – прозрачной.

Консистенция:

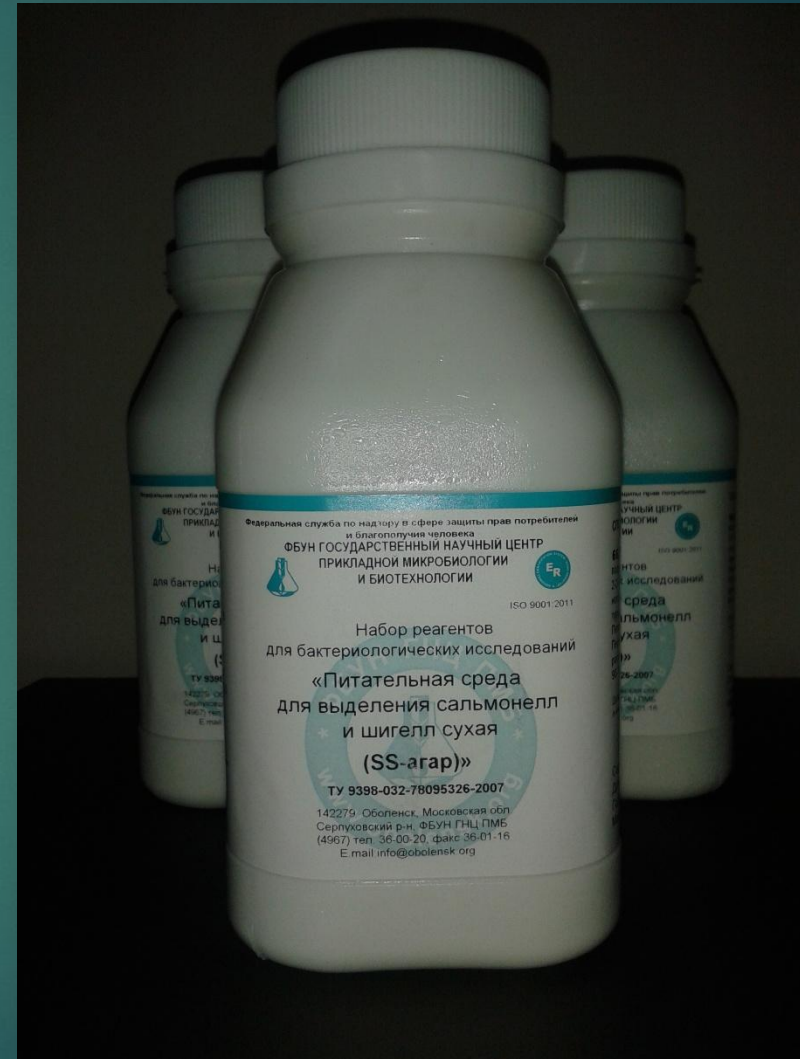
К жидким средам относятся растительные экстракты, сыворотка крови, мясной бульон. На основе жидких сред, добавляя определенные количества агара-агара, желатина, силикагеля, получают полужидкие и плотные среды.

Плотные среды применяются для выращивания чистых культур микроорганизмов, для исследования их свойств, для подсчета количества бактерий в исследуемой пробе.

К сыпучим средам относят среды для промышленного производства. Они состоят из измельченного и увлажненного растительного сырья. На их основе изготавливают силосные корма в животноводстве, соевый соус в пищевом и т. д.

Сухие питательные среды представляют собой гигроскопичный порошок. Это стандартизированные готовые смеси, которые выпускаются промышленным способом и предназначены для приготовления питательных сред в лаборатории. Их преимущества:

- точно известный химический состав;
- долгий срок хранения;
- высокое качество компонентов и высокая степень очистки, которых трудно добиться вне условий специализированной лаборатории;
- удобны при хранении и транспортировке;
- из них просто и быстро можно приготовить питательную микробиологическую среду.



Приготовление питательных сред

Для приготовления питательных сред в лабораториях используют или уже готовые сухие смеси, или проверенные временем рецепты, которые есть в специализированной литературе. Существует более тысячи питательных сред для культивирования различных микроорганизмов. В полужидкие и плотные среды вводят агар-агар или желатин, чтобы добиться нужной консистенции.

После того, как питательная среда изготовлена, ее делают прозрачной, добавляя специальные вещества (например, яичный белок) и отфильтровывая взвешенные частицы. Плотные и полужидкие среды, как правило, фильтруют горячими.

Следующий этап — установить определенный уровень кислотности среды, добавляя раствор кислоты или щелочи. Это очень важно, так как разные микробы и бактерии требуют своего уровня pH. Есть микроорганизмы, которые могут размножаться только в кислой (pH около 9) или только в щелочной (pH=5) среде. Для нейтральной среды уровень кислотности подбирается с точностью до десятых долей, например, pH=7,4. Для контроля кислотности используют цветную индикацию (лакмусовые бумажки, фенолфталейн, метанитрофенол и др.) и фотоколориметры или pH-метры.

Приготовленную питательную среду в конце обязательно стерилизуют, чаще всего методом термообработки, в автоклаве или аппарате Коха. Способ и режим термообработки зависит от вида среды.

Приготовление питательных сред

Посуда для приготовления сред:

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке её в ржавых кастрюлях. Лучше пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить. Новую стеклянную посуду предварительно кипятят 30 минут в 1-2 % растворе хлороводородной кислоты, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.

Посуда для культивирования микроорганизмов

1 – качалочная
колба;

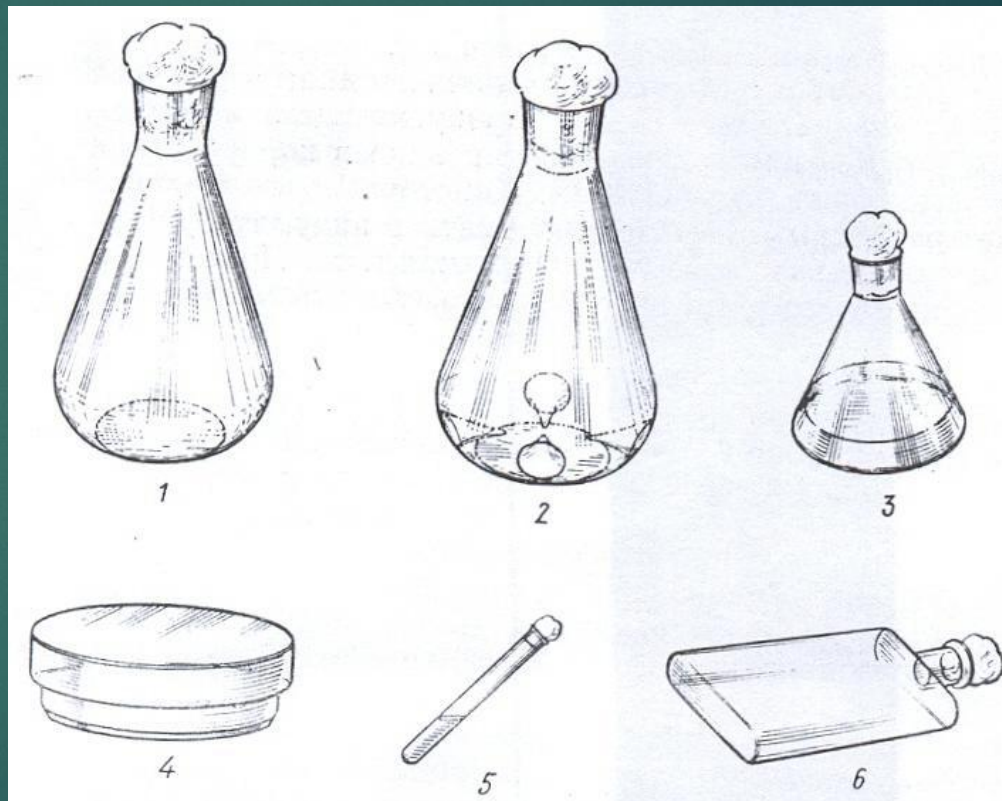
2 – качалочная
колба с
отбойниками;

3 – коническая
колба;

4 – чашка Петри;

5 – пробирка;

6 – матрац.



Сырье:

Исходным сырьём для приготовления большинства сред служат продукты животного и растительного происхождения, а также готовые полуфабрикаты.



Этапы варки

1. Варка.
среды варят на открытом огне, водяной бане, автоклаве или варочных котлах.
2. Установление pH.
ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром или компаратором. При стерилизации pH снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.
3. Осветление.
Производят, если при варке среды мутнеют или темнеют. Для этого используют белок куриного яйца или сыворотку крови.
4. **Фильтрация** жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена — они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

5. **Разливают** среды не более чем на $\frac{3}{4}$ ёмкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

6. **Стерилизация:** режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте.

7. **Контроль.**

- Для контроля стерильности среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.
- *Химический* контроль окончательно устанавливает pH, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.
- Для биологического контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды.



Стерилизация питательных сред

Все питательные среды независимо от их назначения разливают в чистую посуду и стерилизуют. Большинство сред стерилизуют автоклавированием, но при различных режимах.

1. . Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15—20 мин в автоклаве при температуре 115—120°C и давлении 1-1,5 атмосферы.
2. Среда с углеводами и молоком (в состав которого входит лактоза), питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100°C дробно или в автоклаве при 112°C и давлении до 1 атмосферы.
3. . Среда, в состав которых входят белковые вещества (сыворотка крови, асцитическая жидкость), обеспложиваются тиндализацией или фильтрованием.
4. Для стерилизации питательных сред, содержащих в своем составе нативные белки, пользуются фильтрацией через мембранные фильтры Зейтца.



Для контроля стерильности среды после стерилизации помещают в термостат при 37°C на 3-5 сут. Жидкие среды должны оставаться прозрачными, а на поверхности и в толще плотных питательных сред не должны появляться признаки роста. Кроме контроля стерильности, производят химический контроль готовых сред, который заключается в том, что в нескольких образцах каждой серии определяют рН, количество общего и аминного азота и хлоридов

Хранение питательных сред

Приготовленные и стерилизованные питательные среды разливают по большим колбам или культуральным бутылкам и хранят в темных, холодных помещениях с контролируемой влажностью. Перед применением среды с желирующими компонентами (агаром, желатином) нагревают на водяной бане и разливают через воронку или бюретку по сосудам, в которых будет производиться выращивание культур: по биологическим пробиркам или чашкам Петри.

Пробирки устанавливают вертикально или почти горизонтально, чтобы получить среду в виде столбика или скошенную, с увеличенной площадью поверхности.

При работе с аэробными (дышащими кислородом) культурами пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, которые пропускают воздух, но не посторонние микроорганизмы.

Для выращивания и изучения анаэробных микроорганизмов следует ограничить или исключить доступ кислорода к ним. Для этого культуры выращивают под слоем масла, в глубине плотных сред, в атмосфере из углекислого газа. Иногда в среду добавляют специальные вещества, которые связывают кислород.



Сухие питательные хранят в темном сухом месте при температуре 2 – 30 °С. После вскрытия упаковки на флаконе необходимо написать дату и далее хранить при комнатной температуре до окончания срока годности. Приготовленные из сухих смесей и разлитые во флаконы питательные среды хранят 1 мес при комнатной температуре или 3 мес при температуре 2 – 8 °С. Срок годности сред, разлитых в чашки Петри, составляет 7 сут при температуре 2 – 8 °С







Спасибо за внимание

