Среды для культивирования бактерий

Требования к условиям культивирования бактерий

Питательные потребности

простые – растут на универсальных питательных средах

сложные – растут на специальных питательных средах

Температура культивирования

≈ 37°C – мезофилы

6 – 20°C – психрофилы

50 – 60°C – термофилы

Требования к условиям культивирования бактерий

Реакция среды (pH)

кислая – ацидофилы

нейтральная – большинство патогенных бактерий

щелочная – алкалифилы

Условия аэрации

не принимают во внимание – факультативные анаэробы

↓ O_2 – микроаэрофилы

↑ CO_2 – капнофилы

без доступа воздуха – анаэробы

с обязательным доступом воздуха – облигатные аэробы

Характер роста бактерий на плотных питательных средах

Колония – видимое невооруженным глазом скопление бактерий одного вида, являющееся потомством одной клетки. *Колонии бактерий разных видов отличаются:*

-формой;

-величиной;

-прозрачностью;

-цветом;

-высотой;

-характером поверхности и краев;

-консистенцией.

Типы (формы) колоний

S-форма колоний («гладкая»)

кокки

Г–отриц. палочки, кроме Yersinia pestis

R-форма колоний («шероховатая»)

Г+ палочки

Yersinia pestis

Характер роста бактерий на жидких питательных средах

диффузная муть – большинство бактерий

плёнка – «коховские бактерии»

придонный или пристеночный рост – стрептококки

плёнка со спускающимися вниз «сталактитами» – Yersinia pestis

Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий

Физические

культивирование в анаэростате (выкачивается воздух) или аппарате Киппа (замещается инертным газом, например азотом)

трубки Виньяль-Вийона(смешивание с расплавленной и охлаждённой питательной средой с её последующим застыванием – глубинное культивирование)

засев уколом в высокий столбик(полужидкой среды)

культивирование под слоем масла

регенерация жидкой питательной среды перед засевом (кипячение с последующим быстрым охлаждением)

метод Перетца (в чашку Петри заливается охлаждённая среда, смешанная с культурой, на поверхность – предметное стекло, сняв которое можно легко добраться до выросшей культуры)

Химические

в замкнутом объёме протекает химическая реакция с поглощением кислорода

метод Аристовского (сыпучие ингредиенты)

метод Омелянского (жидкие ингредиенты)

включение в питательную среду редуцирующих веществ (связывают растворённый в среде кислород)

глюкоза

Биологические

метод Фортнера (в замкнутом объёме культивируются анаэробы и жадный аэроб – после прекращения роста которого в безкислородной среде начинают расти анаэробы)

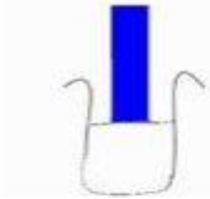
Метод Китта-Тароцци

среда Китта-Тароцци МПБ с глюкозой

на поверхности – масло на дне – кусочки печени

Основные требования к питательным средам

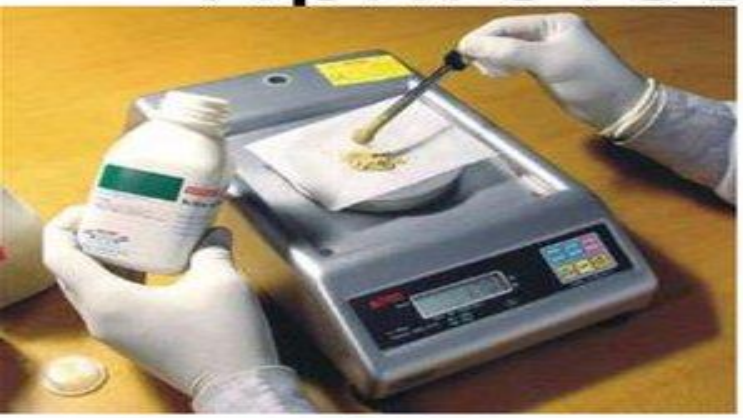
- оптимальное содержание питательных веществ в легкоусвояемой форме (органические источники углерода,
- набор минеральных солей, факторы роста),
- адекватное для соответствующей группы бактерий значение pH,
- определенный окислительно-восстановительный потенциал,
- достаточное содержание воды,
- стерильность



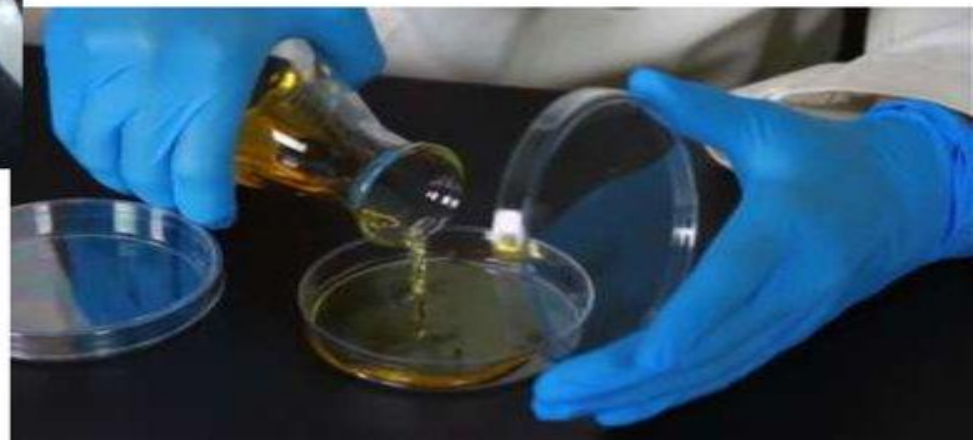
Классификация питательных сред

- Питательные среды делят *по консистенции и назначению.*
- В зависимости от *консистенции* различают жидкие (мясопептонный бульон, сахарный бульон), плотные (1-2% мясопептонный агар), полужидкие (0,3-0,9% мясопептонный агар) питательные среды. Для приготовления плотных питательных сред в жидкие среды добавляют 1,5-2% агара – экстракта из морских водорослей, основным компонентом которого является полисахарид агароза. Агар плавится при температуре около 90°С и застывает при температуре около 40°С, обеспечивая питательной среде после застывания консистенцию геля. Агар не расщепляется абсолютным большинством микроорганизмов, выступая в средах как инертный формообразующий компонент.
- В зависимости от *назначения* выделяют простые (универсальные), обогащенные, селективные, дифференциально-диагностические среды и среды с комбинированными свойствами

Приготовление питательной среды



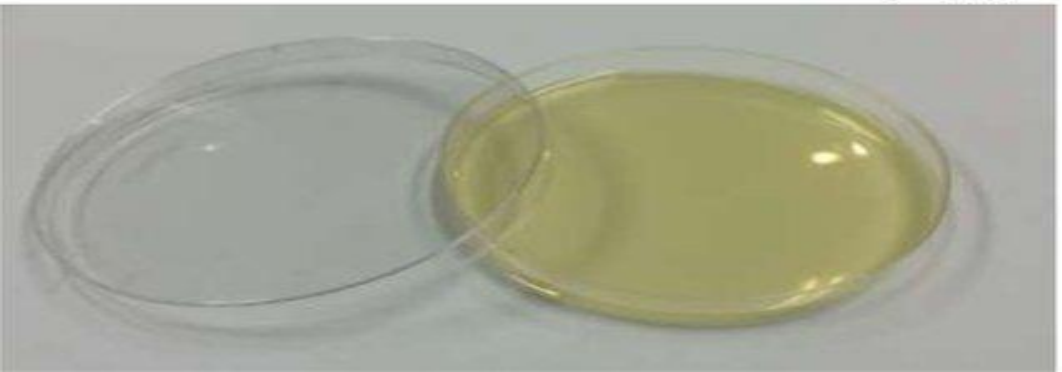
- Для получения готовой среды необходимо взвешиванием отмерить нужное количество порошка, растворить его в воде, нагреванием расплавить находящийся в нем агар, провести стерилизацию, асептически добавить нетермостойкие добавки и разлить в стерильную лабораторную посуду.



Простые (универсальные, основные) питательные среды

- Основа сред - *пептоны*, которые готовят из природных источников с высоким содержанием белка (отходы мясного производства, рыбная мука, соя, казеин) путём частично гидролиза пепсином или трипсином.
- Пептоны содержат аминокислоты и пептиды, а также липиды, витамины и многие другие органические и минеральные вещества.
- Добавляется NaCl (изотоничность)
- Иногда вносятся мясной или дрожжевой экстракт.
- Простые среды подходят для культивирования широкого спектра неприхотливых микроорганизмов, таких как *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.*
- Могут использоваться для приготовления сложных сред
- ***Примеры:***

- мясо-пептонный бульон (**МПБ**) — жидкая среда
- мясо-пептонный агар (**МПА**) — плотная среда
- ГРМ (гидролизат рыбной муки+ натрияхло



триптон-соевый агар

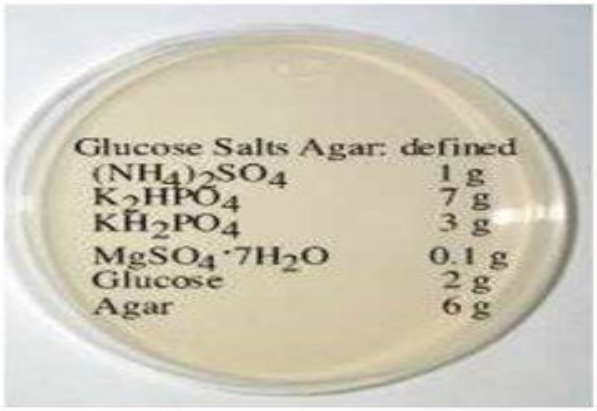
Обогащенные питательные среды

- Помимо компонентов простых сред они содержат дополнительные ингредиенты, стимулирующие рост прихотливых микроорганизмов.
- Обогащенные углеводами (сахарный бульон/агар)
- Обогащенные белками (шоколадный агар, сывороточный, асцит бульон/агар; Brain-heart broth - бульон с сердечно-мозговой вытяжкой для культивирования требовательных патогенных микроорганизмов)

- *«Шоколадный» агар* – содержит эритроциты, разрушенные нагреванием. Высвобождаемые из них вещества (в том числе гемоглобин и NAD) обеспечивают рост таких микроорганизмов, как *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*.

Селективные (избирательные) питательные среды

- Обеспечивают выделение определенных групп микроорганизмов, подавляя рост сопутствующей микрофлоры. Создание неблагоприятных условий для нежелательных микроорганизмов может достигаться различными способами.



Минимальные питательные среды

- имеют строго определенный химический состав, что достигается использованием высокоочищенных синтетических компонентов.
- Обычно содержат одно или несколько органических веществ и набор минеральных солей.
- Селективность достигается за счёт нехватки источников энергии, аминокислот или витаминов для посторонних микроорганизмов.
- Например, среда, не содержащая триптофана, будет ингибировать рост штаммов, не синтезирующих самостоятельно триптофан.
- Основными областями применения минимальных питательных сред являются исследования метаболизма и генетики бактерий.

- минимальная среда М-9, в которой источником энергии и углерода является глюкоза, а азота — NH4C1

Селективные (избирательные) питательные среды

- ***Питательные среды с нестандартным pH*** используются для избирательного выделения ацидофильных или алкалифильных микроорганизмов. Так, закисленные среды используются для выделения представителей рода *Lactobacillus*, щелочные – для *Vibrio cholerae*.

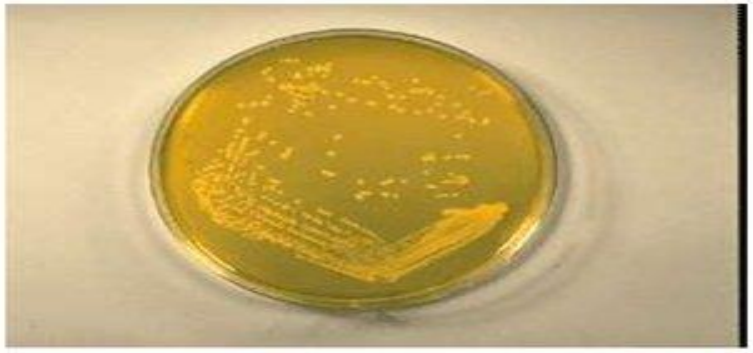
- Среда MRS (аббревиатура фамилий разработчиков) (pH 6,2) для представителей рода *Lactobacillus*

- Среда Левенштейна-Йенсена (pH 5,9) для Mycobacterium tubercculosis

- Рост *Vibrio cholerae на щелочном агаре через 18 часов в отраженном свете.*

Селективные (избирательные) питательные среды

- ***Питательные среды с селективными добавками*** содержат различные вещества, токсичные для нежелательных микроорганизмов. Так, среды с желчью (например, желчный бульон) используются для выделения сальмонелл. Высокая концентрация соли позволяет селективно выделять из биологического материала стафилококков. Часто в качестве селективных добавок используются смеси антибиотиков.



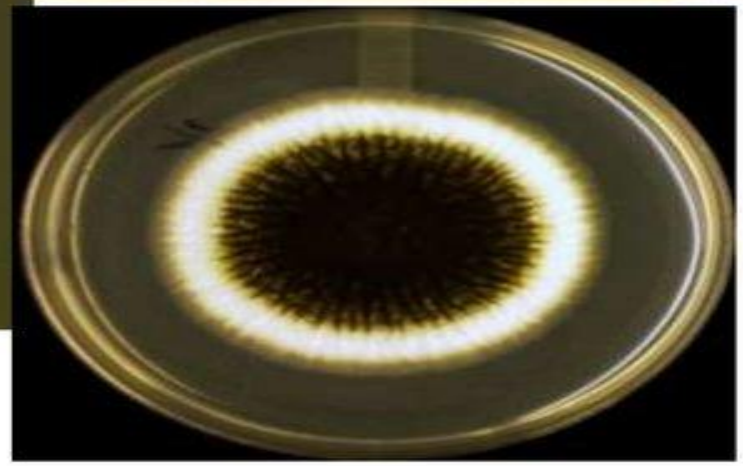
- Солевой агар для *S. aureus*

- Желчный бульон 20%

Для выделения сальмонелл

- ЖЕЛЧНЫЙ БУЛЬОН С БРИЛЛИАНТОВЫМ ЗЕЛЕНЫМ 2%
- Среда содержит два ингибитора роста грамположительных и некоторых грамотрицательных микроорганизмов - краситель бриллиантовый зеленый и бычья желчь.

Селективные (избирательные) питательные среды



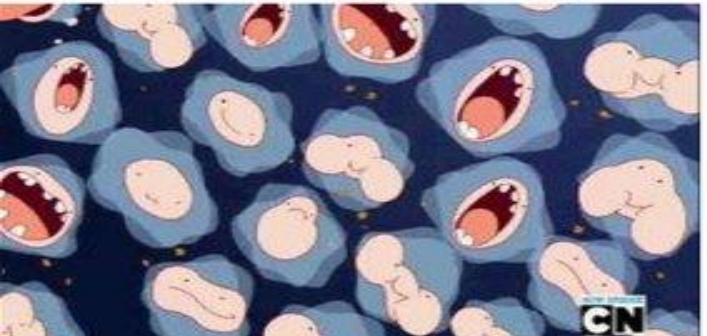
- *Среда Леффлера* (свернутая сыворотка крови с сахарным бульоном) - эффективна для дифтерийной палочки

Агар Сабуро
для обнаружения Candida и плесневых грибов

Дифференциально-диагностические среды

- Состав данных сред подобран таким образом, чтобы микроорганизмы с разными физиолого-биохимическими свойствами различались внешне по характеру роста – окрашивали бы среду в разные цвета или отличались бы по цвету колоний.
- Позволяют дифференцировать визуально группы или виды бактерий по ферментативной активности

- В основе дифференциально-диагностических питательных сред могут лежать различные принципы



Дифференциально-диагностические среды

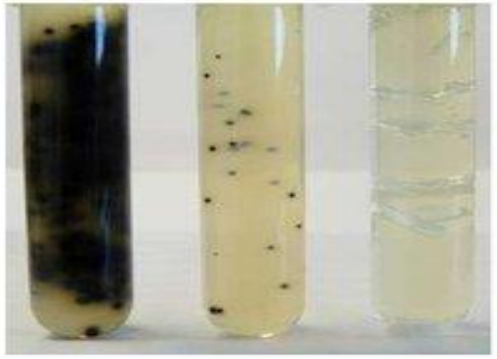
- ***Среды, содержащие субстрат и индикатор*** – позволяют определять способность бактерий утилизировать соответствующие субстраты.
- Углеводы (например, сахароза, лактоза, арабиноза) или многоатомные спирты (сорбитол, маннитол, инозитол) могут подвергаться брожению с образованием в качестве конечных продуктов органических кислот. Поэтому их использование в энергетическом метаболизме приводит к *закислению* среды.
- Другие субстраты (лимонная кислота, мочевина, аргинин, орнитин, лизин), напротив, могут вызывать *защелачивание* питательной среды при их расщеплении бактериями.
- Соответствующие изменения pH приводят к изменению цвета добавленного в среду вещества-индикатора.

Среды Гисса (МПА, набор углеводов, индикатор)

Среда Симмонса для определения способност микроорганизмов утилизировать цитраты

Дифференциально-диагностические среды

- ***Среды для выявления продукции H_2S*** – содержат SO_4^{2-} или SO_3^{2-} в качестве источника серы, а также ионы железа. Производимые бактериями ионы S^{2-} в данных средах будут образовывать черный нерастворимый сульфид железа.
- Например, среда Вильсон-Блэр, клостридиум агар

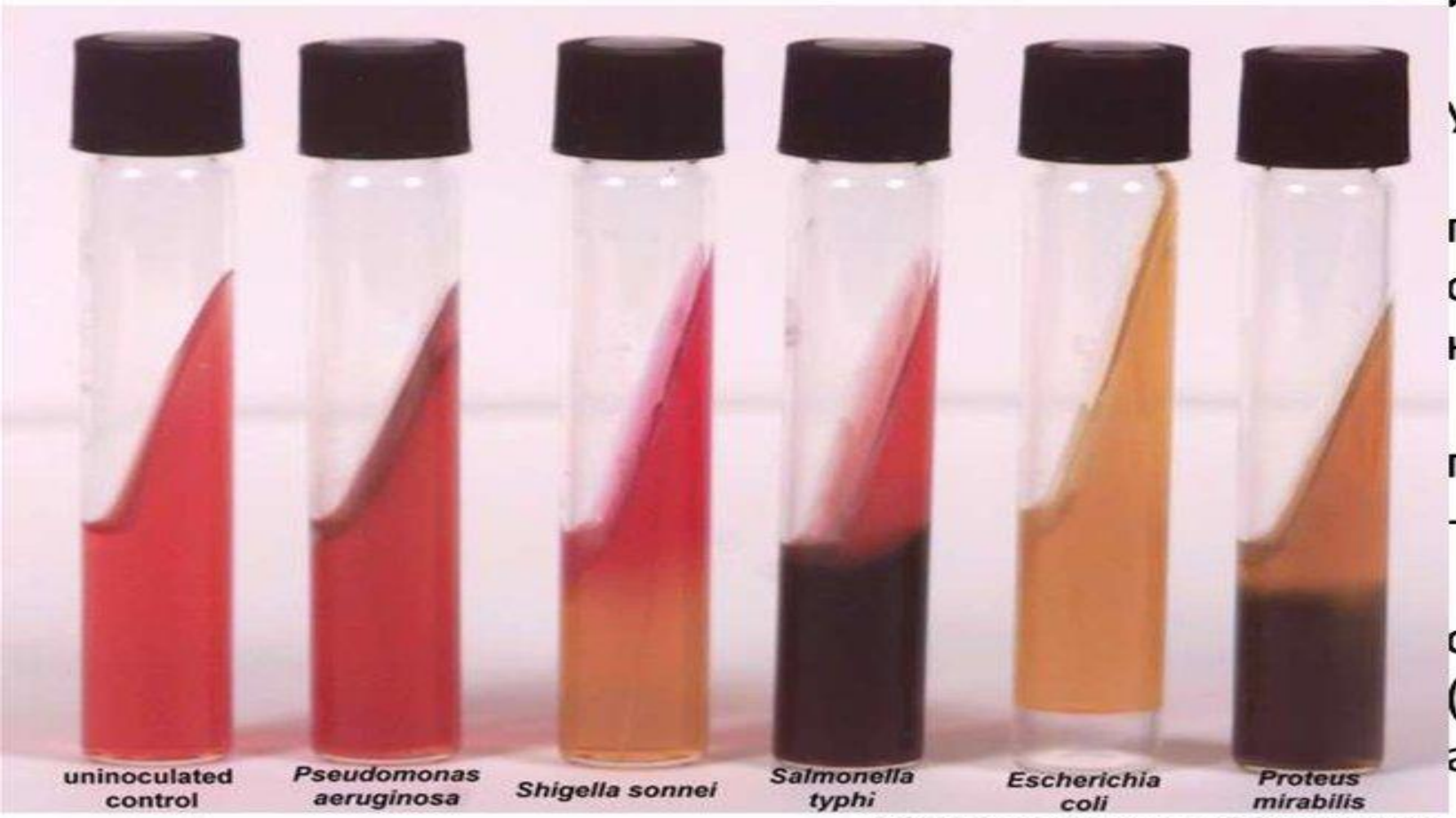


▪На фото рост клостридий на среде Вильсон-Блер

▪Часто используется комбинации перечисленных подходов в одной питательной среде, что позволяет дифференцировать сразу несколько групп микроорганизмов(например, среда Клиглера).

▪Наибольший спектр сочетаний предоставляет использование хромогенных субстратов, окрашивающихся в разные цвета.

Среда Клиглера:



ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain

- Содержит 1% лактозу, 0.1% глюкозу, тиосульфат натрия и сульфат железа, индикатор фенол рот.

Посев по поверхности и уколом в столбик агара.

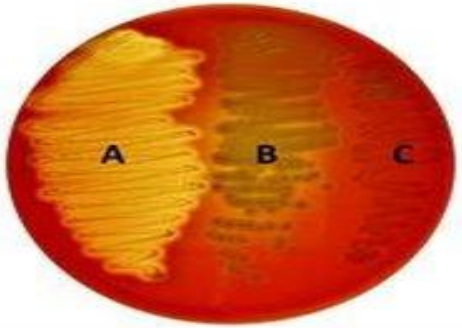
При ферментации только глюкозы – желтый столбик, скошенная часть не меняет окраску.

При ферментации и глюкозы, и лактозы (E.coli) – весь агар желтый

При образовании сероводорода (сальмонеллы, протей) – агар чернеет

Среды с комбинированными свойствами

- ***Кровяной агар и его производные*** – являются одновременно обогащенными и дифференциально-диагностическими питательными средами.
- В данных средах содержится 5-10% крови, которая стимулирует рост различных прихотливых микроорганизмов.
- Дифференциально-диагностические свойства проявляются как образование зон гемолиза вокруг колоний некоторых микроорганизмов, хорошо заметных на фоне непрозрачно-красного кровяного агара:
- *Альфа-гемолиз* выглядит как зеленовато-коричневая зона, возникающая в результате перехода гемоглобина в метгемоглобин (*Streptococcus pneumoniae)*.
- *Бета-гемолиз (полный гемолиз)* представляет собой полное разрушение эритроцитов и выглядит как прозрачная зона вокруг колонии (*Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus)*.



Среды с комбинированными свойствами

- ***Желточно-солевой агар (среда Чистовича)*** – используется для выделения золотистых стафилококков, является одновременно селективной и дифференциально-диагностической питательной средой.
- Селективный компонент представлен содержанием 7.5%-10% NaCl, что ингибирует рост большинства бактерий за исключением стафилококков.

- Дифференциально-диагностические свойства обеспечиваются добавленным в среду яичным желтком. Для *Staphylococcus aureus* характерна продукция *лецитиназы*, которая расщепляет лецитин желтка, что проявляется образованием мутных венчиков вокруг колоний.

Среды с комбинированными свойствами

- ***Маннит-солевой агар с феноловым красным (среда Чапмена)***– используется для выделения золотистых стафилококков, является одновременно селективной и дифференциально-диагностической питательной средой.
- Селективный компонент представлен содержанием 7.5%-10% NaCl, что ингибирует рост большинства бактерий за исключением стафилококков.
- Штаммы Staphylococcus aureus, вырастающие на этой среде, ферментируют маннит и образуют желтые колонии, окруженные зоной пожелтения среды.
- Большинство коагулазоотрицательных стафилококков и микрококков не ферментируют маннит и растут, образуя мелкие красные колонии, окруженные красной или лиловой зоной.
- Цвет среды и колоний определяется реакцией индикатора фенолового красного

Среды с комбинированными свойствами

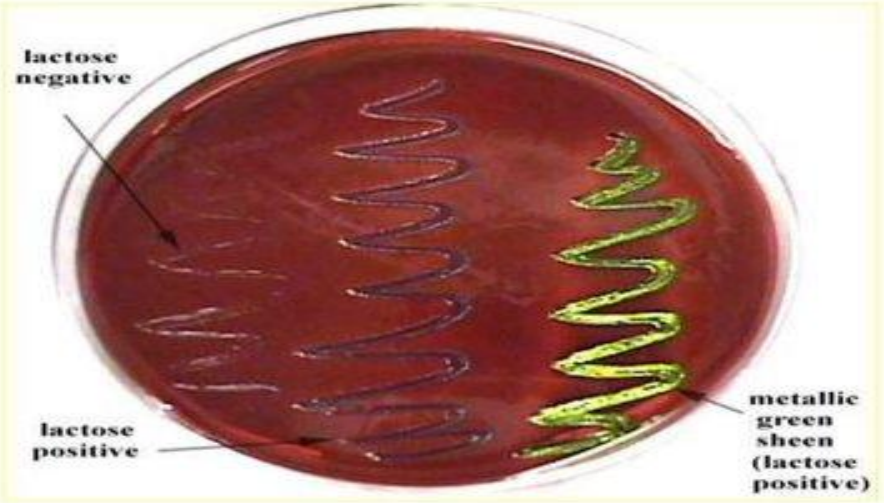
- ***Среда Эндо*** – является одной из сред для выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*, к которому относятся бактерии родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*.
- **Состав**: мясопептонный агар, ***лактоза,фуксин,сульфит натрия (Na2SO3),***
- Принцип действия: фуксин обесцвечивается сульфитом натрия и образуется бесцветная фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа)- селективный компонент, подавляет рост грамположительных микроорганизмов.
- Лактоза в составе среды может сбраживаться многими представителями *Enterobacteriaceae* до муравьиной кислоты,которая реагирует с реактивом Шиффа, что приводит к высвобождению фуксина, в результате чего колонии и среда вокруг них окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него.
- Исходный цвет среды – бледно-розовый
- лактозо-негативные (не сбраживающие лактозу) бактерии образуют на ней прозрачные колонии,
- лактозо-позитивные - пурпурные с металлическим блеском.

Лактозо-негативные

Лактозо-позитивные

Среды с комбинированными свойствами

- ***Среда Левина (EMB-агар-*** *Eosin Methylene Blue Agar)* – *аналог среды Эндо*
- вместо фуксинсернистой кислоты содержит красители эозин и метиленовый синий, формирующие темный осадок с металлическим блеском при снижении pH вокруг лактозо-позитивных колоний



Спасибо за внимание
уважаемые студенты !