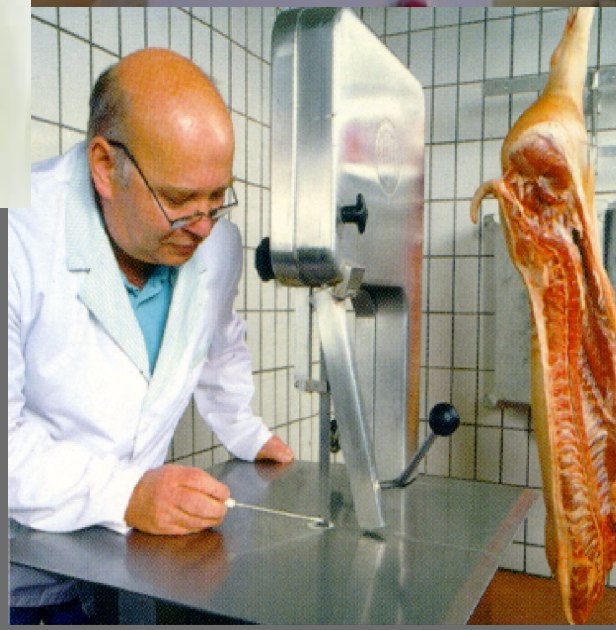
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Питательные среды, их классификация

Питательные среды (приготовление)



По происхождению питательные среды делят на естественные, искусственные и синтетические.

Искусственные питательные среды применяют для:

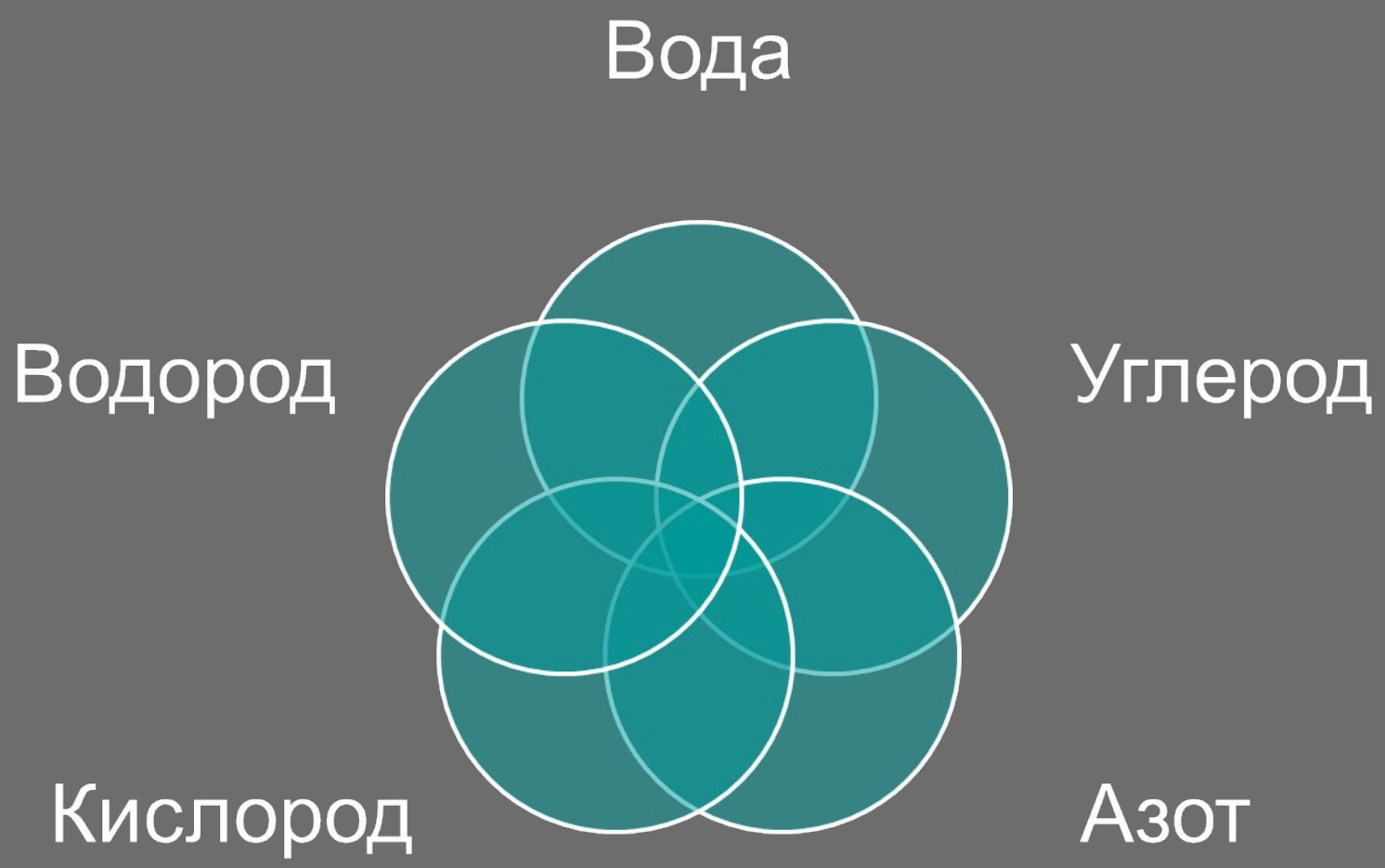
- Выращивания микробов
- Выделения их в чистой культуре
- Изучения свойств
- Сохранения
- Производства бактерийных препаратов

«Золотой стандарт»-классический бактериологический метод, заключается в выделении и идентификации микроорганизма.

Культивирование микробов **– это сложный процесс их размножения, протекающий под влиянием соответствующих условий окружающей среды:**

- наличия питательных веществ;
- температуры;
- pH;
- аэрации и др.

Важнейшие биогенные элементы, необходимые для роста микроорганизмов:



Основы питательных сред:

- Мясо и его продукты;
- Рыба;
- Куриные яйца;
- Растительное сырье: картофель; кукуруза, пшеница, бобы, водоросли;
- Казеин;
- Дрожжи.

Уплотнители сред:

- Агар-агар;
- Желатин;
- Различные гели (силикагель и др.);
- Целлюлозные продукты.

Классификация питательных сред

- По физическому состоянию (в зависимости от консистенции):

- жидкие (бульон, пептонная вода);
- полужидкие (до 1% агара);
- полутвердые (1 – 1,5% агара);
- плотные (более 1,5% агара);
- сухие (порошок, таблетки или гранулы).

- По целевому назначению различают основные и специальные среды (диагностические).

По происхождению питательные среды делят на естественные, искусственные и синтетические.

- Естественные среды готовят из натуральных продуктов - овощей (картофель, морковь), молока, яиц, сыворотки крови и пр.
- Искусственные среды содержат переработанные естественные продукты (мясную воду, мясной перевар), вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты и др.) и различные добавки.
- Синтетические среды готовят из химически чистых соединений с точно известным количественным и качественным составом (аминокислоты, углеводы, витамины, минеральные соли и др.).

По составу принято делить питательные среды на простые и сложные.

- к простым (основным) средам относятся мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА); их готовят на основе мясной воды (настой измельченного мяса), к которому добавляют пептон, NaCl и устанавливают нужное значение pH; плотность МПА создает агар-агар. Простой средой является и пептонная вода, содержащая дистиллированную воду, 1% пептона и,0,5% NaCl.

- сложные среды получают из простых сред (МПБ и МПА), добавляя в них различные дополнительные компоненты: глюкозу, кровь, желчь, куриные яйца, различные соли, индикаторы и т.п.

По целевому назначению различают основные и специальные среды (диагностические).

Основные (простые или универсальные) среды - мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА), на которых культивируют многие патогенные бактерии.

Специальные среды

Специальные среды:

-Сложные среды с повышенной питательной ценностью

-Элективные (избирательные, селективные).

-Примеры элективных сред:

-а) Среда Ру (свернутая неразведенная сыворотка крови) или среда Леффлера элективна для дифтерийной палочки (Corynehactherium diphtheriae)

- б) Щелочной агар и щелочная пептонная вода элективны для холерного вибриона (Vibrio cholerae),

-в) Желточно-солевой агар (ЖСА) элективен для стафилококков, которые могут размножаться при содержании в среде до 10% NaCl, а другие бактерии не выносят повышенной концентрации соли.

- г) Желчный бульон элективен для сальмонелл, размножение которых стимулирует добавленная 10% желчь.

-д) Селенитовая среда, в которой содержится 10% кислого селенитового натрия, способствует накоплению патогенных энтеробактерий (сальмонелл и шигелл).

Специальные среды:

- Дифференциально-диагностические среды позволяют отличать (дифференцировать) одни роды и виды микроорганизмов от других по характеру их ферментативной активности. Такими средами являются: среды с углеводами и индикаторами, на которых выявляют сахаролитическую активность выделяемой чистой культуры.

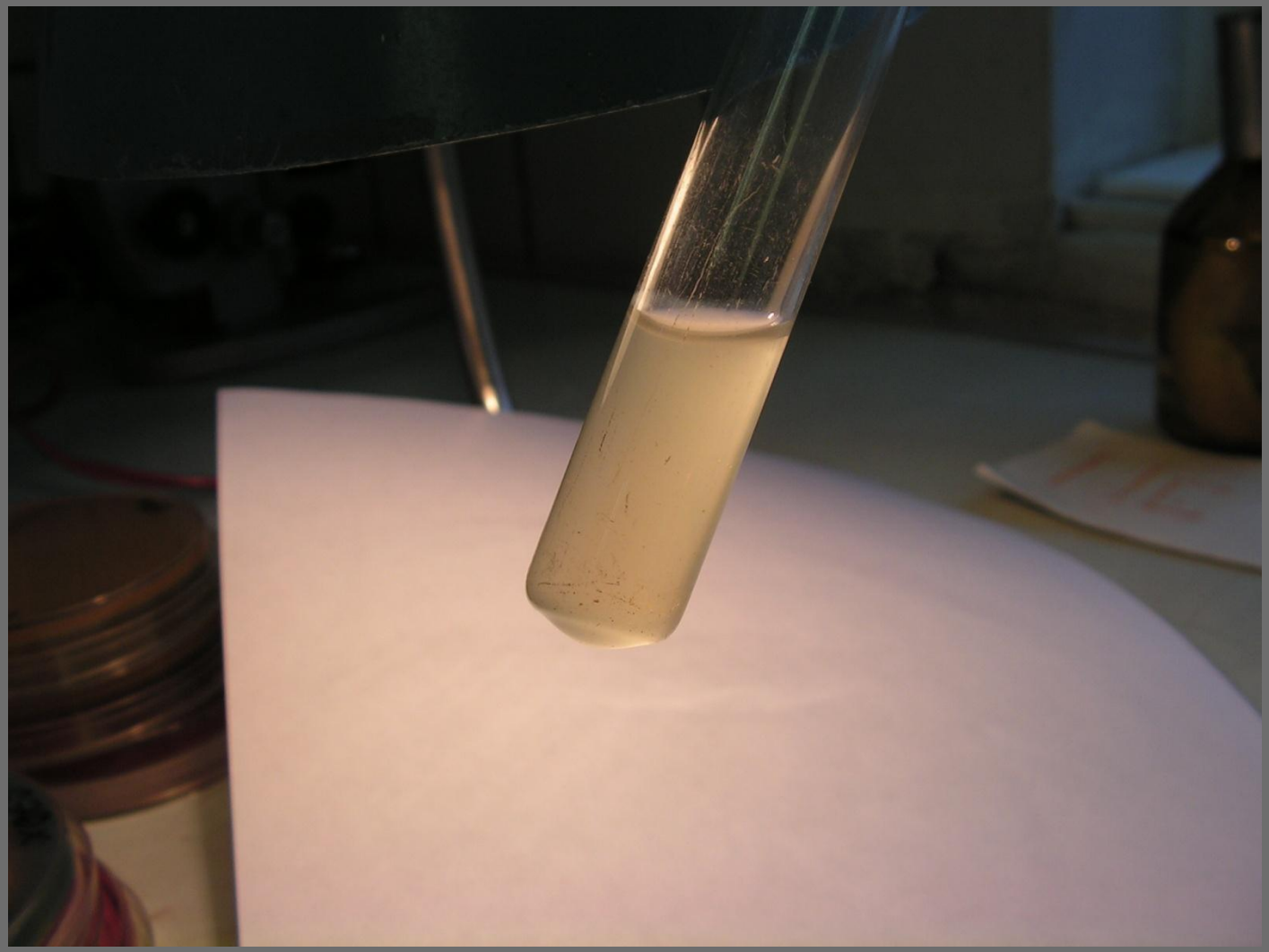
Примеры дифференциально-диагностических сред с углеводами: среды Эндо и Левина, применяемые на 1-м этапе выделения чистой культуры энтеробактерий, среды Гисса, предназначенные для биохимической идентификации чистой культуры на 3-м этапе исследования; среды, содержащие белковые субстраты - желатину, сыворотку крови, кровь, молоко и другие, позволяющие выявить протеолитическую и гемолитическую активность культуры; среды с различными веществами, например цитратом, мочевиной и др., которые усваиваются одними видами микроорганизмов и не усваиваются другими;

- Элективно-дифференциальные среды, сочетающие избирательность размножения группы определяемых бактерий и различия в характере роста отдельных видов.

- Транспортные - предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

Например: агар Сальмонелла Шигелла (среда Плоскирева) – селективная и дифференциальная среда, применяемая для выделения Salmonella spp. и Shigella spp. из фекалий, мочи, а также свежих и консервированных пищевых продуктов.

Транспортная среда для холерного вибриона – 1% пептонная вода pH 8,4 с теллуритом калия



Рост кишечной палочки на среде Эндо

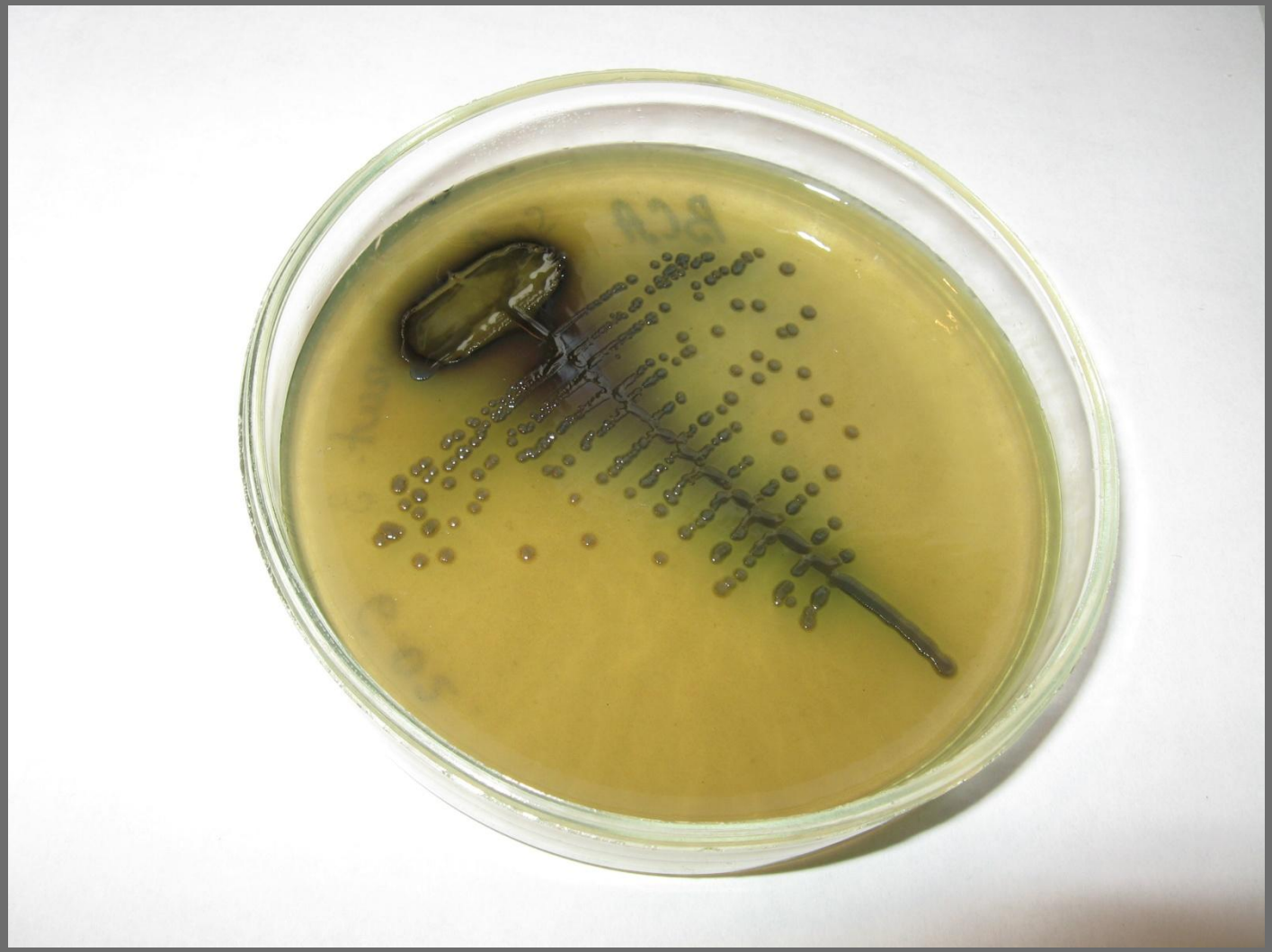
На среде можно наблюдать рост красных или бесцветных колоний. Эшерихии разлагают лактозу до кислых продуктов, в том числе альдегидов, они соединяются с сульфитом натрия, при этом освобождается фуксин, который окрашивает колонии и среду в красный цвет, часто с металлическим зеленоватым блеском (положительный результат).

Сальмонеллы и шигеллы не разлагают лактозу и образуют бесцветные колонии (отрицательный результат). При росте лактозоположительных бактерий их колонии окрашиваются в темно-красный цвет с металлическим блеском, лактозоотрицательные кишечные палочки образуют бесцветные колонии.

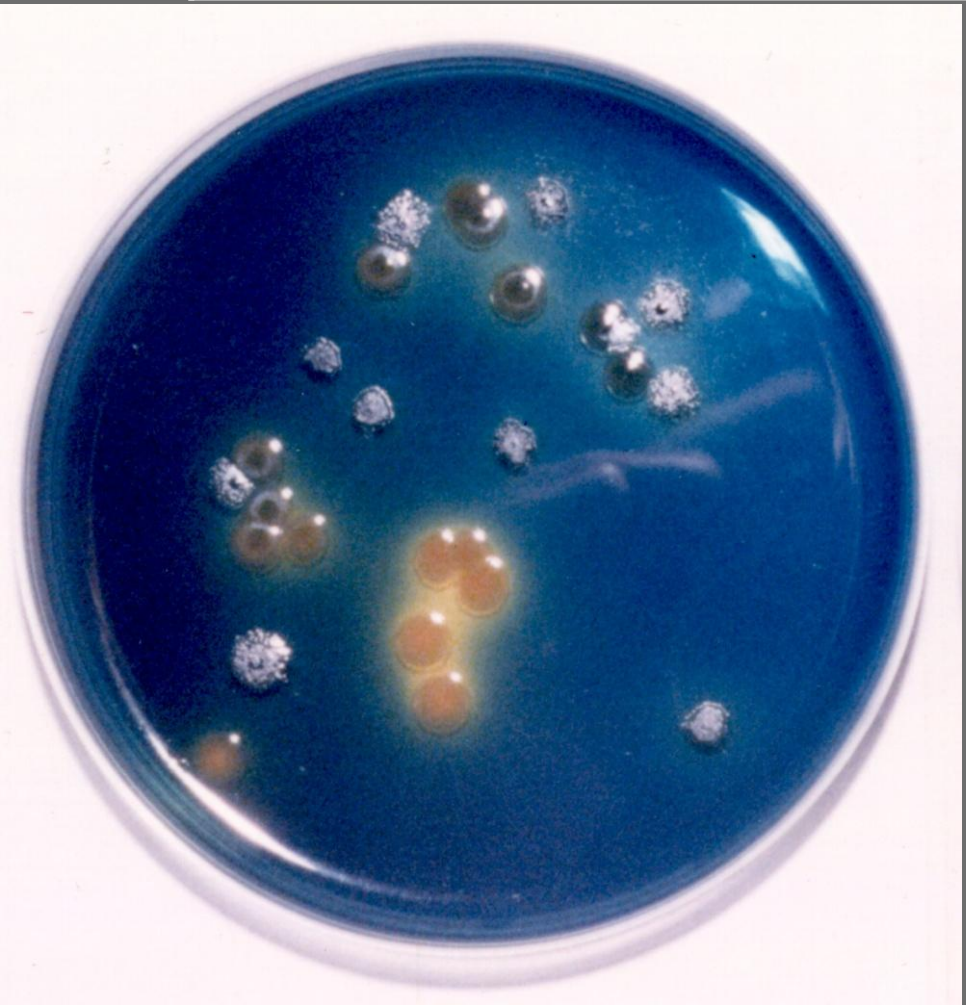
<u>Контроль качества:</u> колонии патогенных бактерий должны быть бесцветны, колонии E.coli – красные.

Рост кишечной палочки на среде Плоскирева

Рост сальмонелл на ВСА



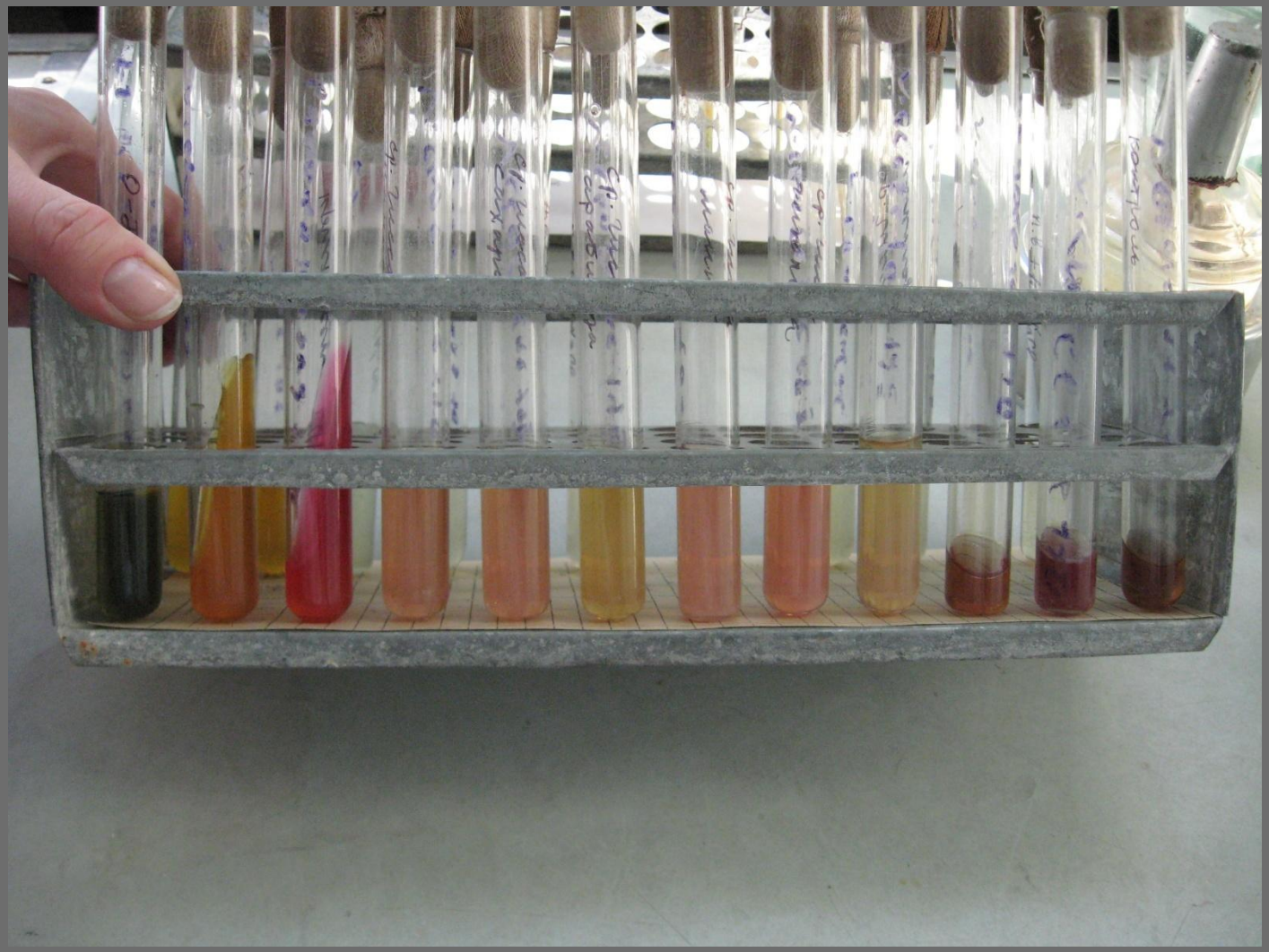
Иерсиниозная	Среда типа
среда	TCBS



Дифференциально-диагностические среды применяются для идентификации микробов:

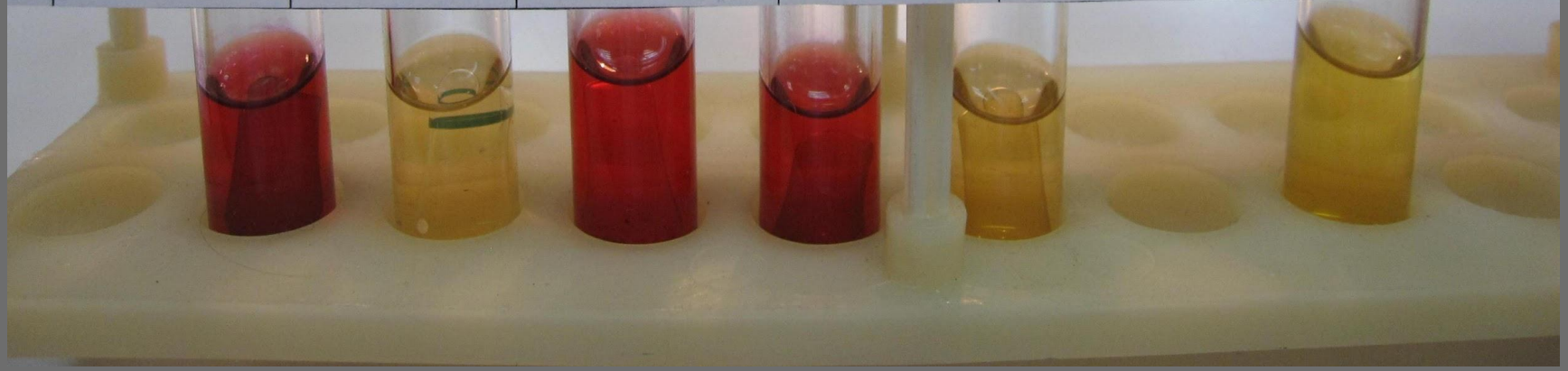
- среды Гисса – набор жидких или полужидких сред, содержащих 1% сахара или спирта + индикатор
- среды для определения уреазной активности (Ленской, Кристенсена)
- определения продукции сероводорода
- продукции индола
- протеолитической активности
- подвижности бактерий

Среды Гисса и другие диагностические среды



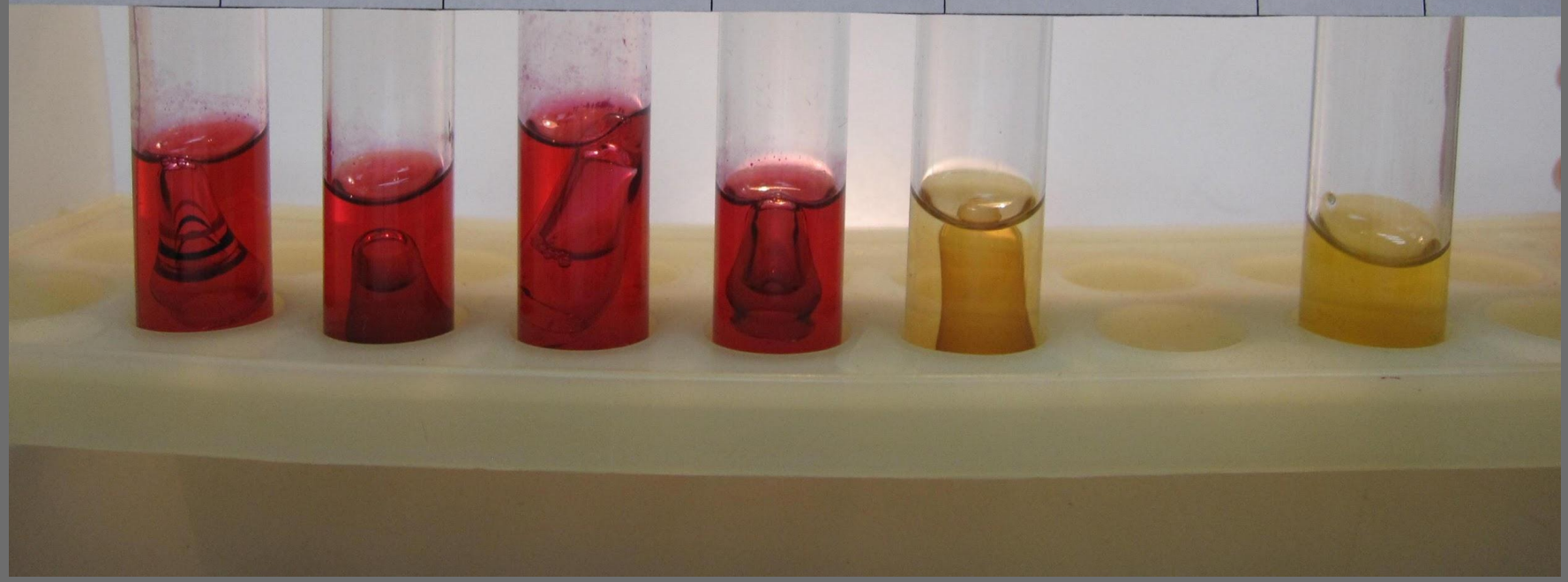
Salmonella серовара *Typhi*

Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H_2S
к	**-**	**к**	**к**	**-**	**-**	**+**

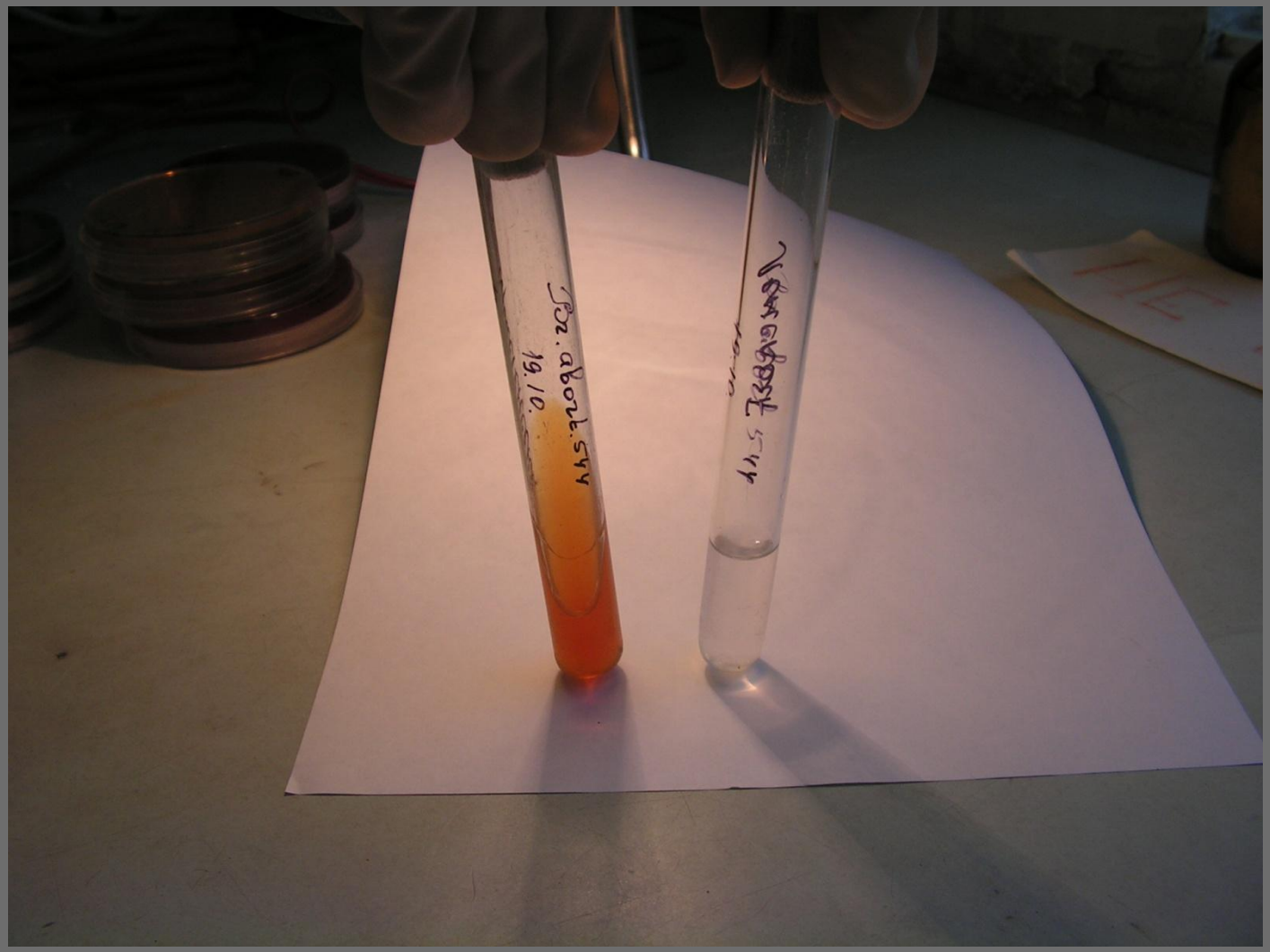


Escherichia coli

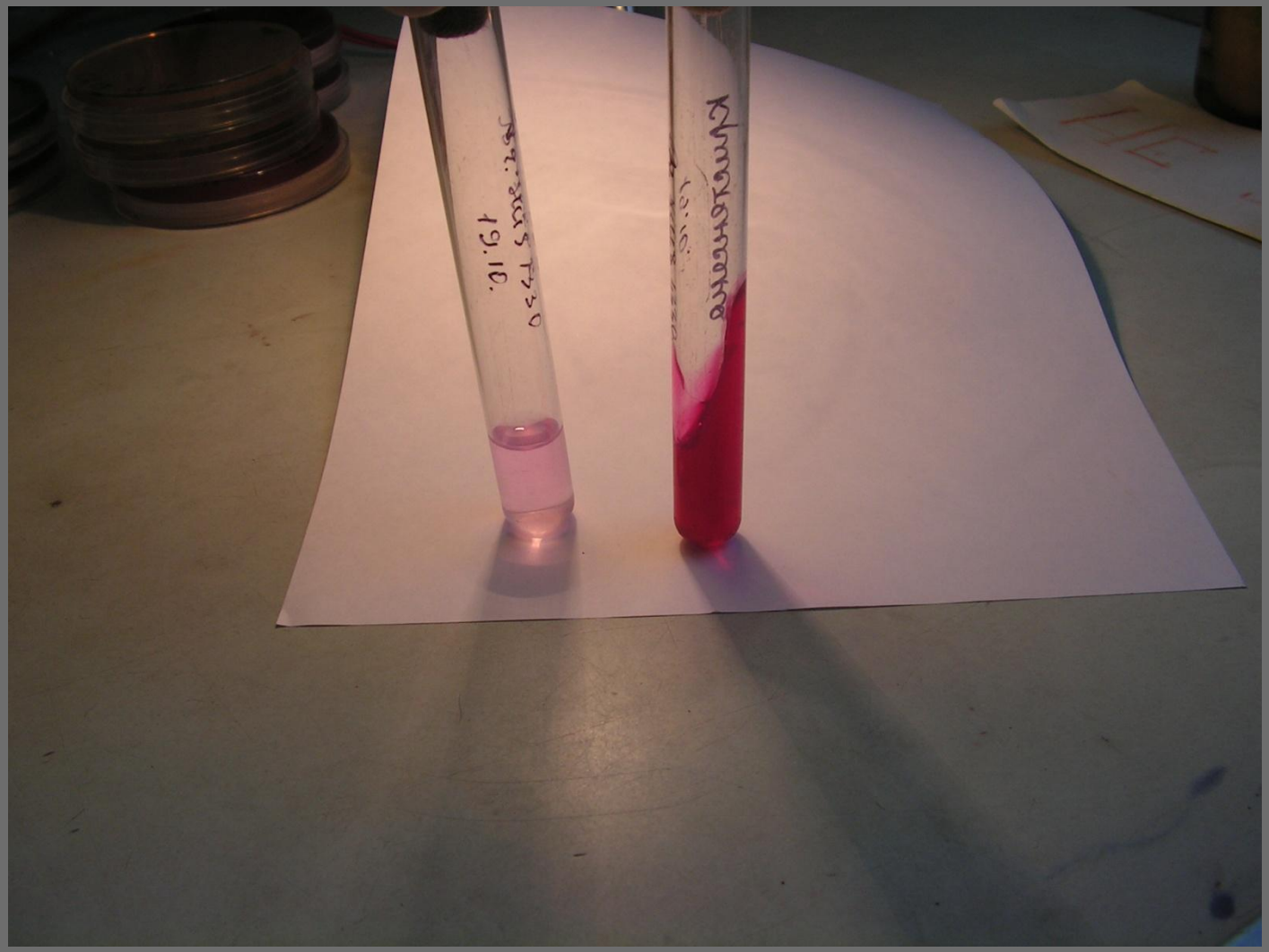
Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H_2S
КГ	**КГ**	**КГ**	**КГ**	**-**	**+**	**-**



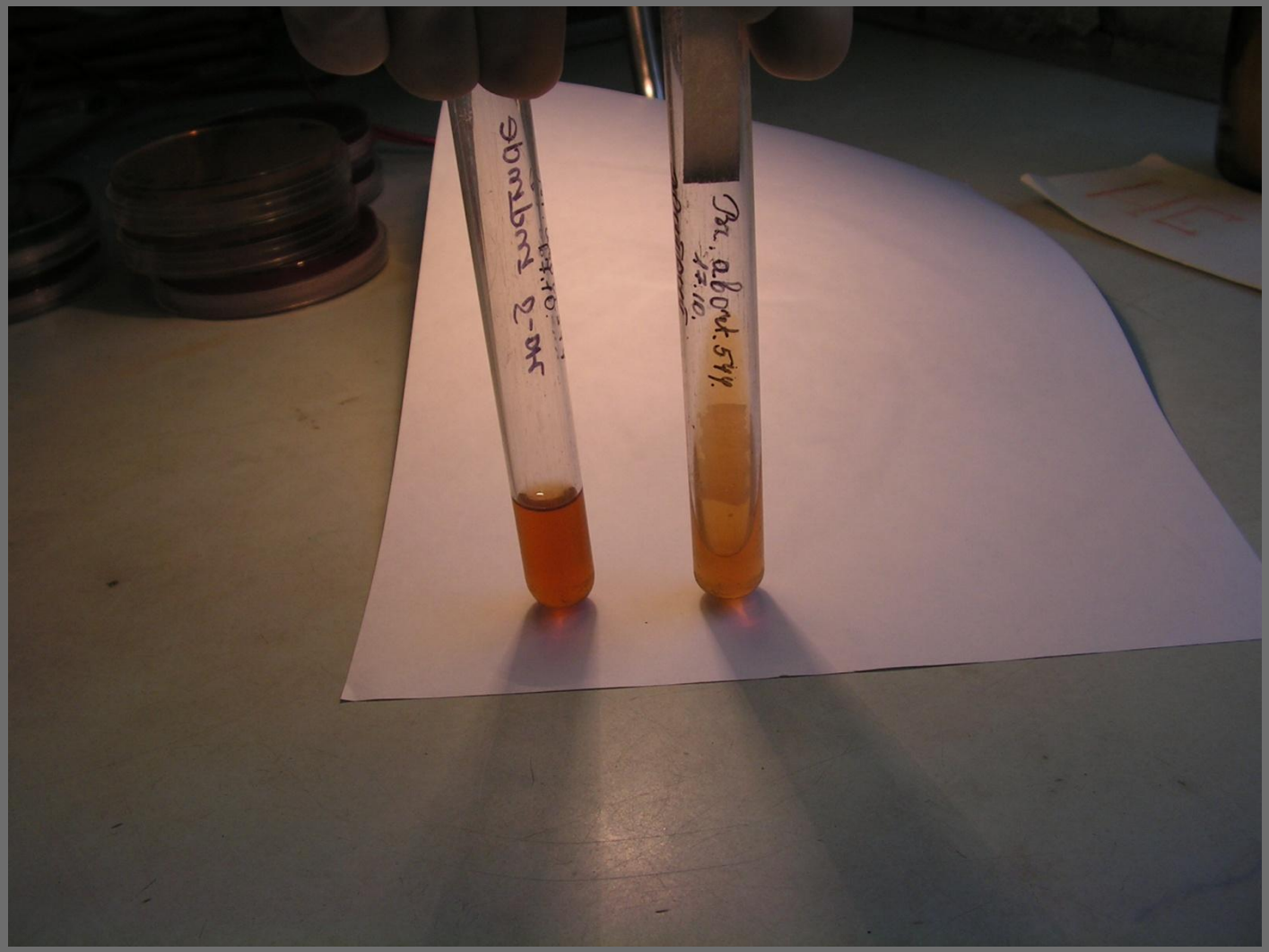
Среды для определения уреазной активности Ленской и Кристенсена (уреаза -)



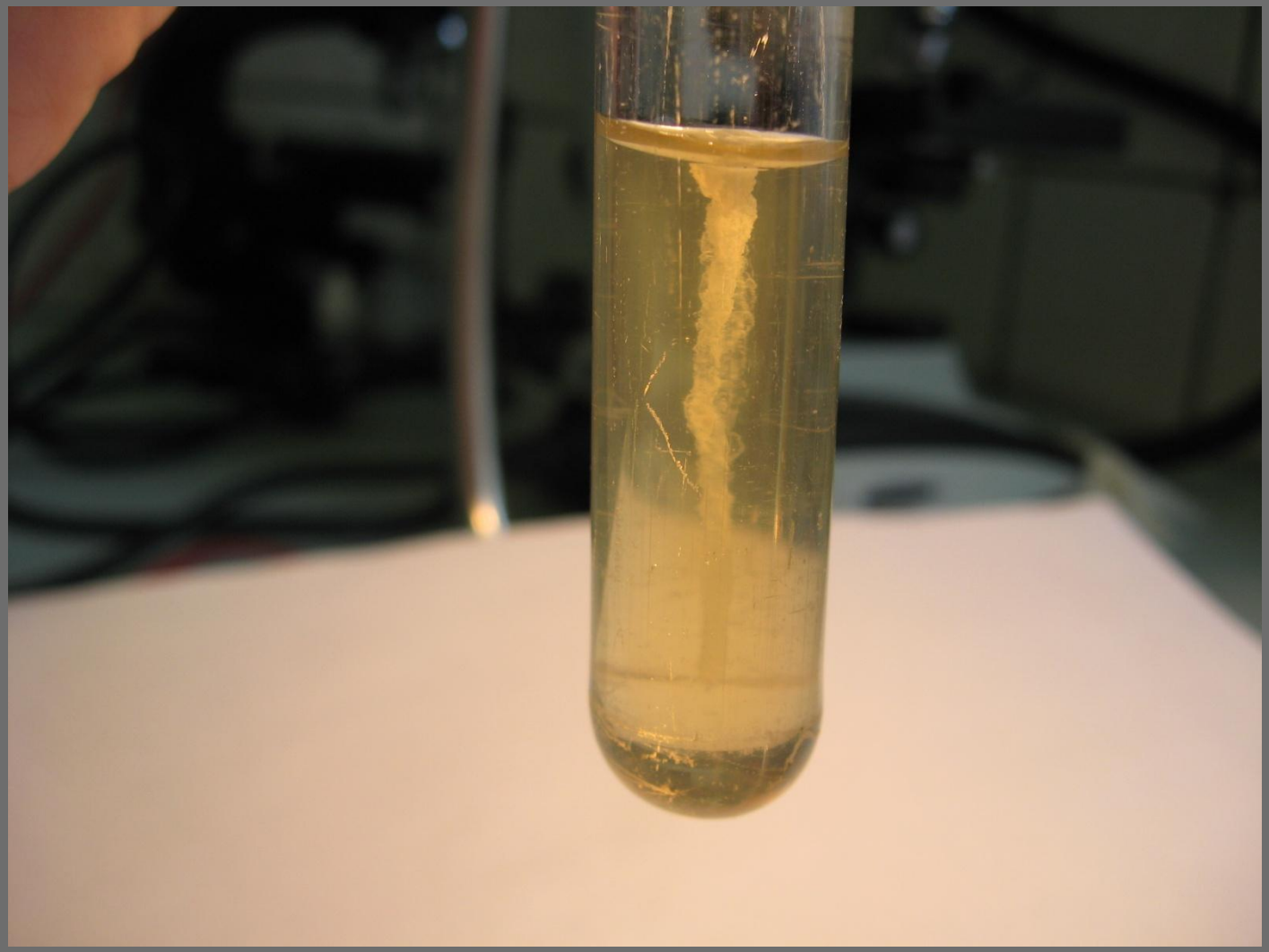
Рост бруцелл на средах Ленской и Кристенсена (уреаза +)



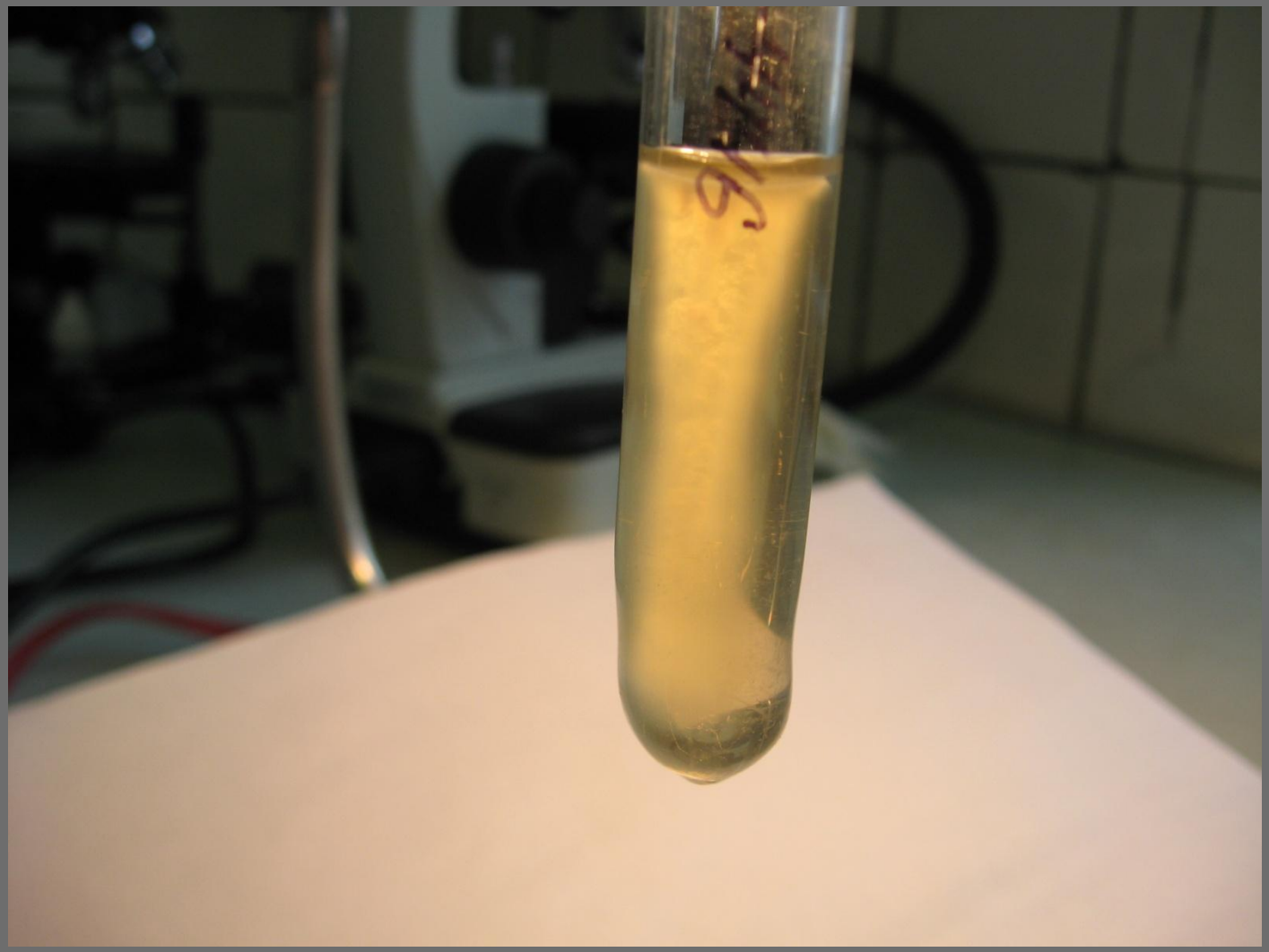
Определение образования сероводорода (почернение индикаторной полоски)



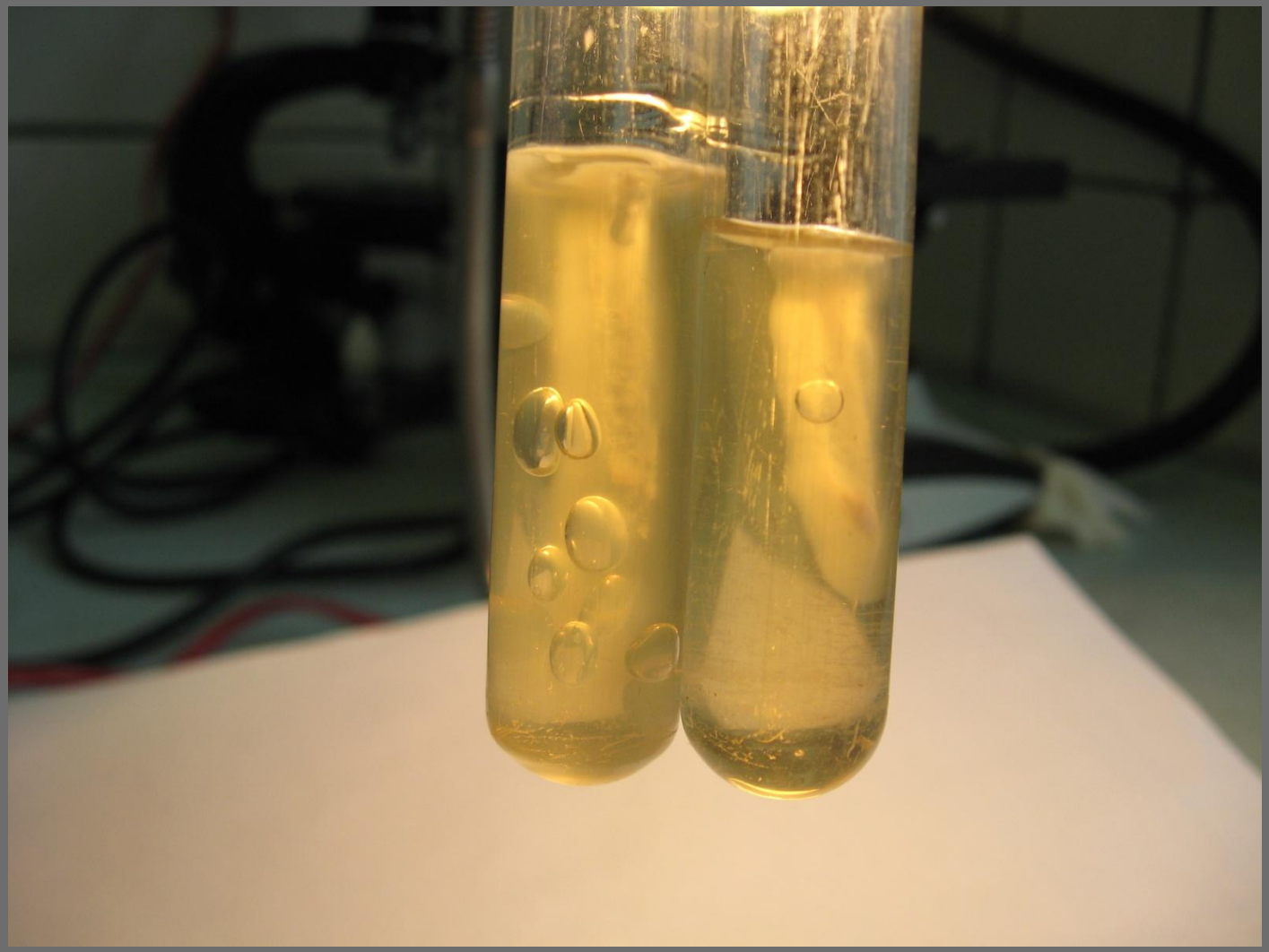
Изучение подвижности шигелл на 0,3% агаре Хоттингера (неподвижны)



Изучение подвижности сальмонелл на 0,3% агаре Хоттингера (подвижны)



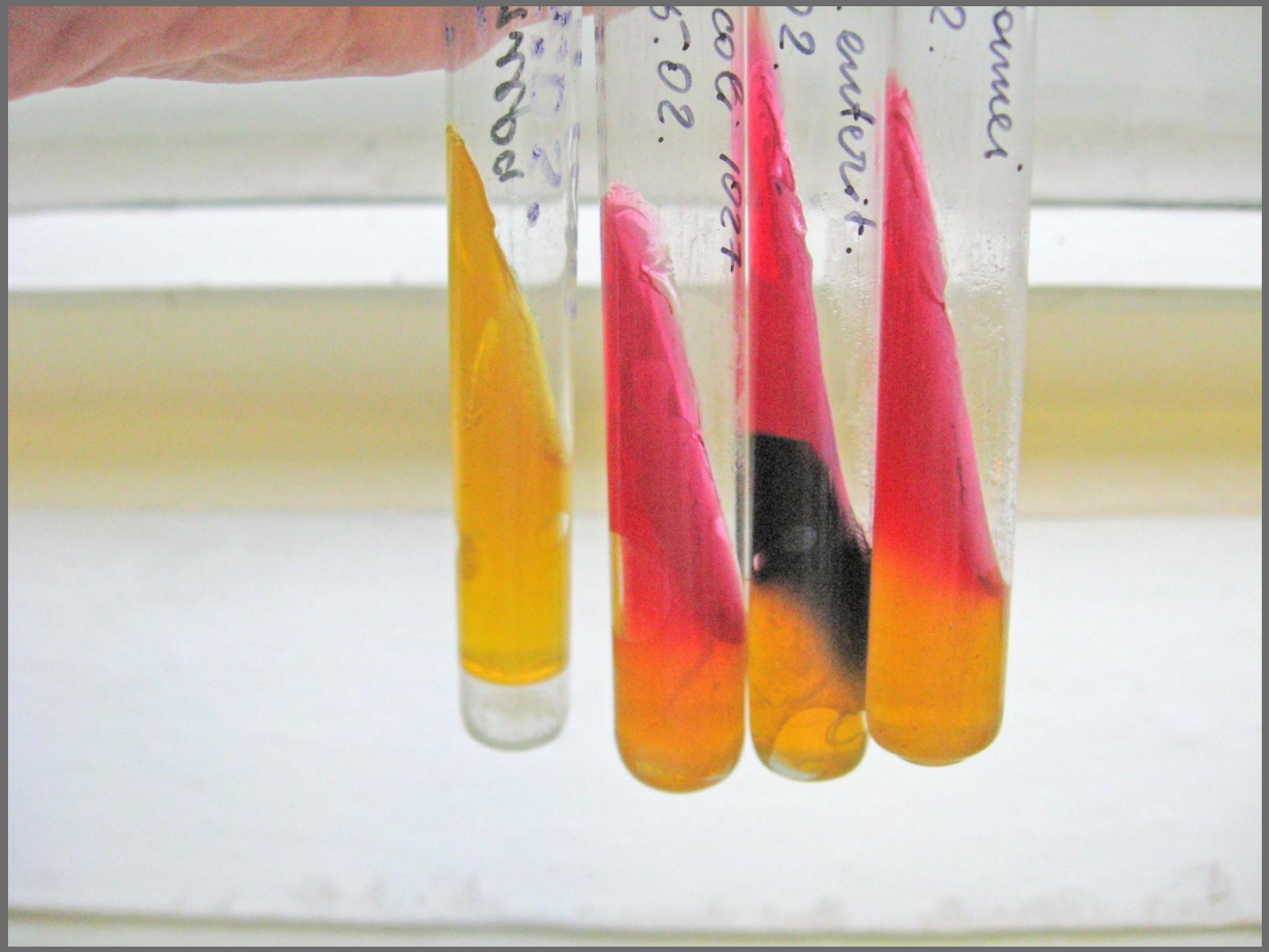
Рост кишечной палочки на 0,3% агаре Хоттингера (подвижность + газообразование)



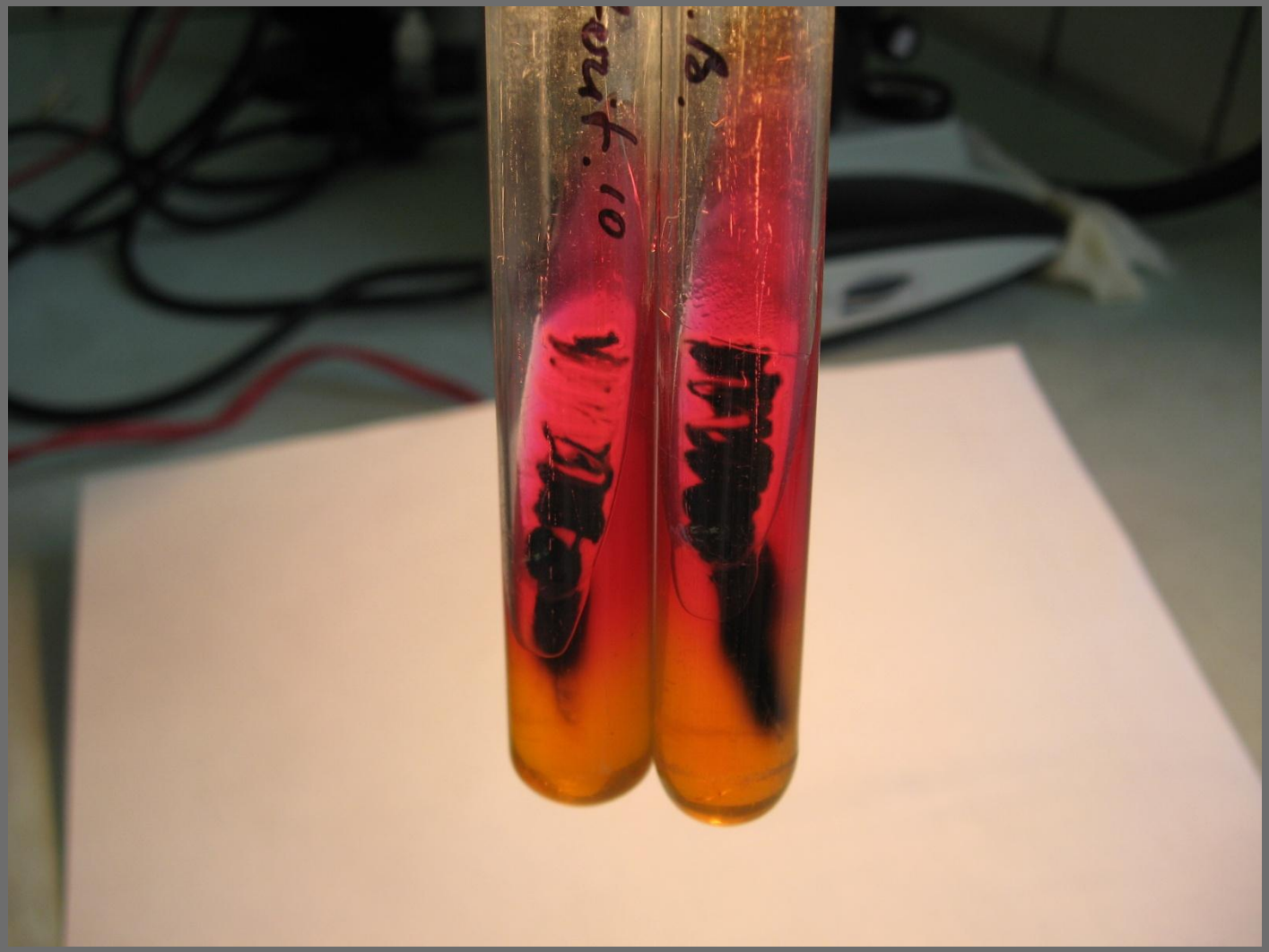
- **Комбинированные среды**

позволяют одновременно изучить несколько свойств микроба (среды Ресселя, Клиглера, Олькеницкого).

Рост культур шигелл, сальмонелл, ЭПКП, кишечной палочки (комменсал) на среде Клиглера



Рост сальмонелл на среде Клиглера

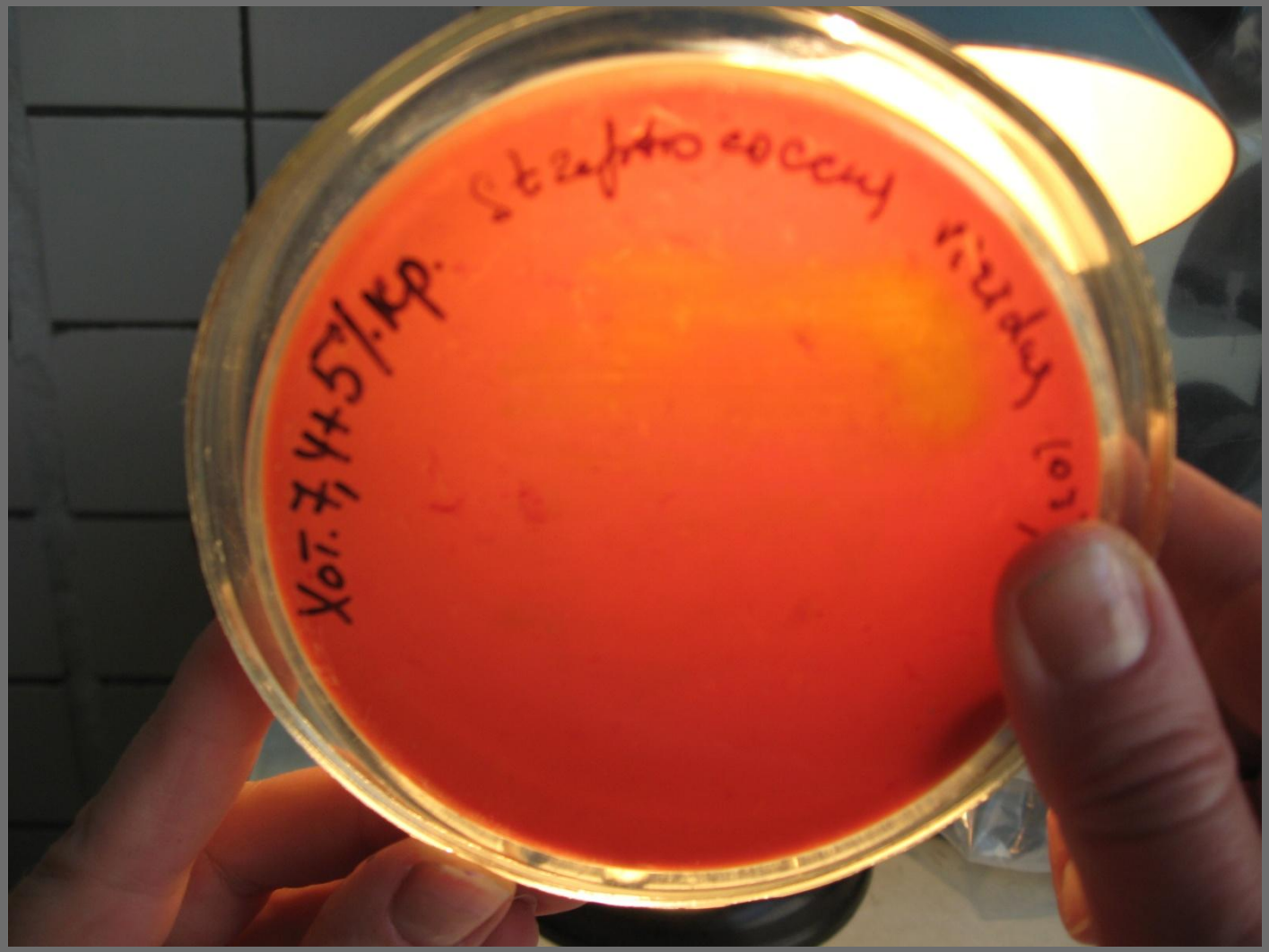


Специальные среды

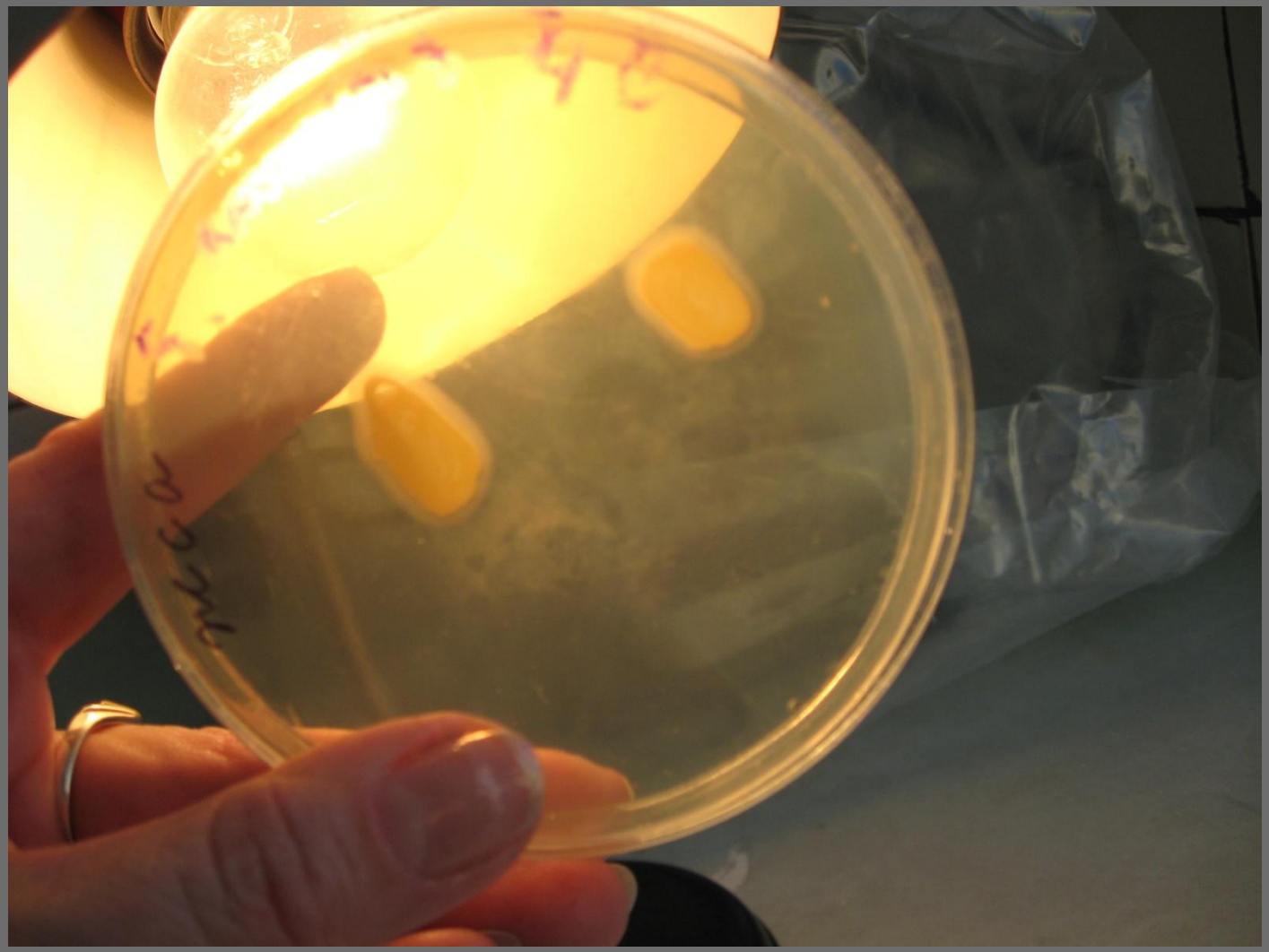
Используются для изучения определенных свойств микроба: кровяной агар, агар с желтком, среда для определения чувствительности к антибиотикам (АГВ, Мюллера-Хинтона) и др.

Рост колоний холерного вибриона на кровяном агаре (β-гемолиз)

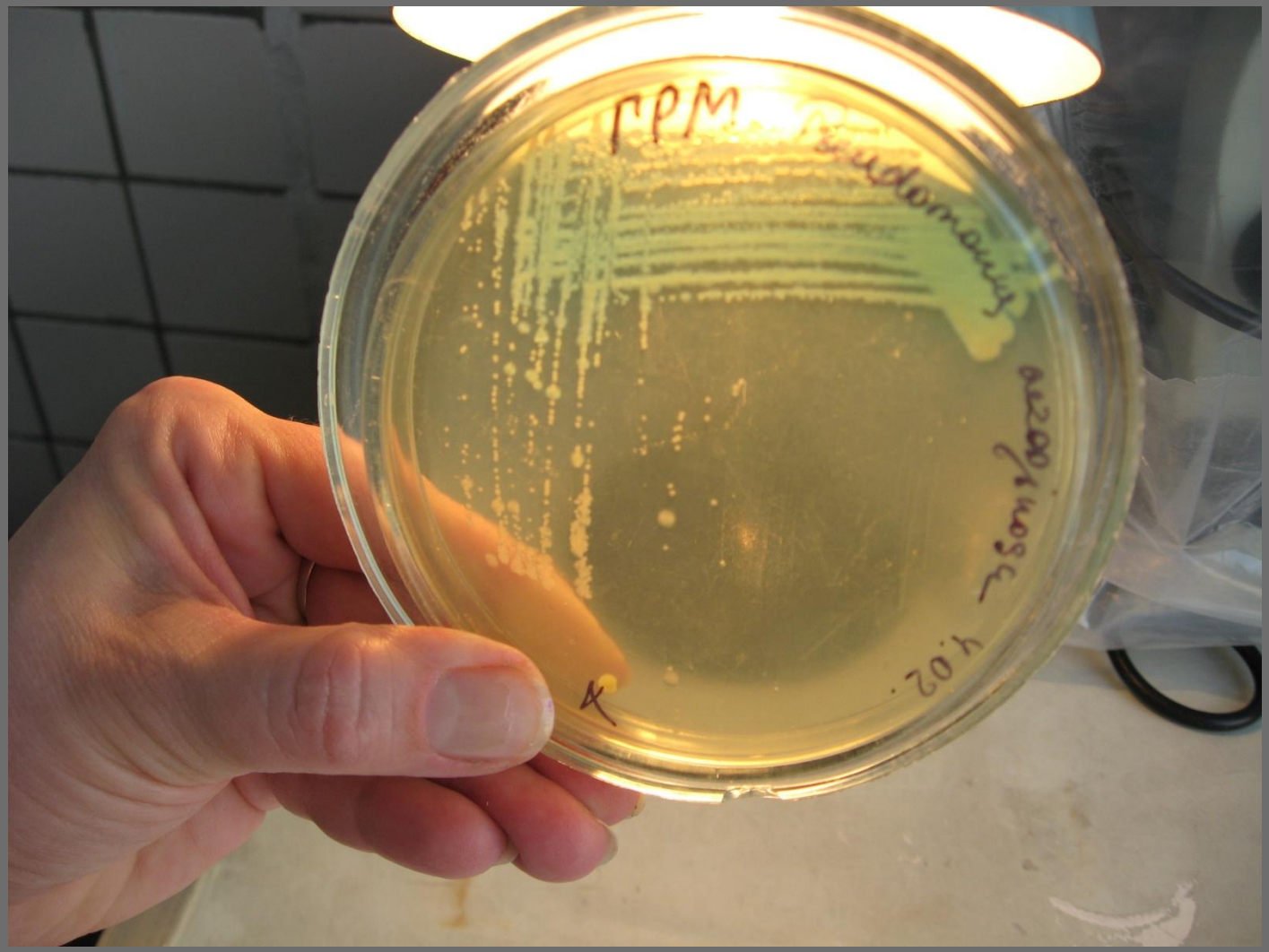
Рост зеленящего стрептококка на агаре с 5% дефибринированной крови барана (α-гемолиз)



Рост стафилококка на желточно-солевом агаре



Посев синегнойной палочки на среду ГРМ для изучения образования пигмента пиоцианина



Изучение чувствительности бруцелл к тионину и фуксину для определения их вида

Сухие питательные среды

Выпускаются в порошках или гранулах.

Преимущества:

- Компактны,
- Легко готовить,
- Удобно хранить и транспортировать,
- Более стандартны, чем среды, приготовленные на основе гидролизатов.

Сухие питательные среды

- **Стимуляторы роста**: кровь и сыворотка крови, желток, сахара (глюкоза), витамины (тиамин). Аминокислоты, препараты других микроорганизмов (сарцины Карпузиди).

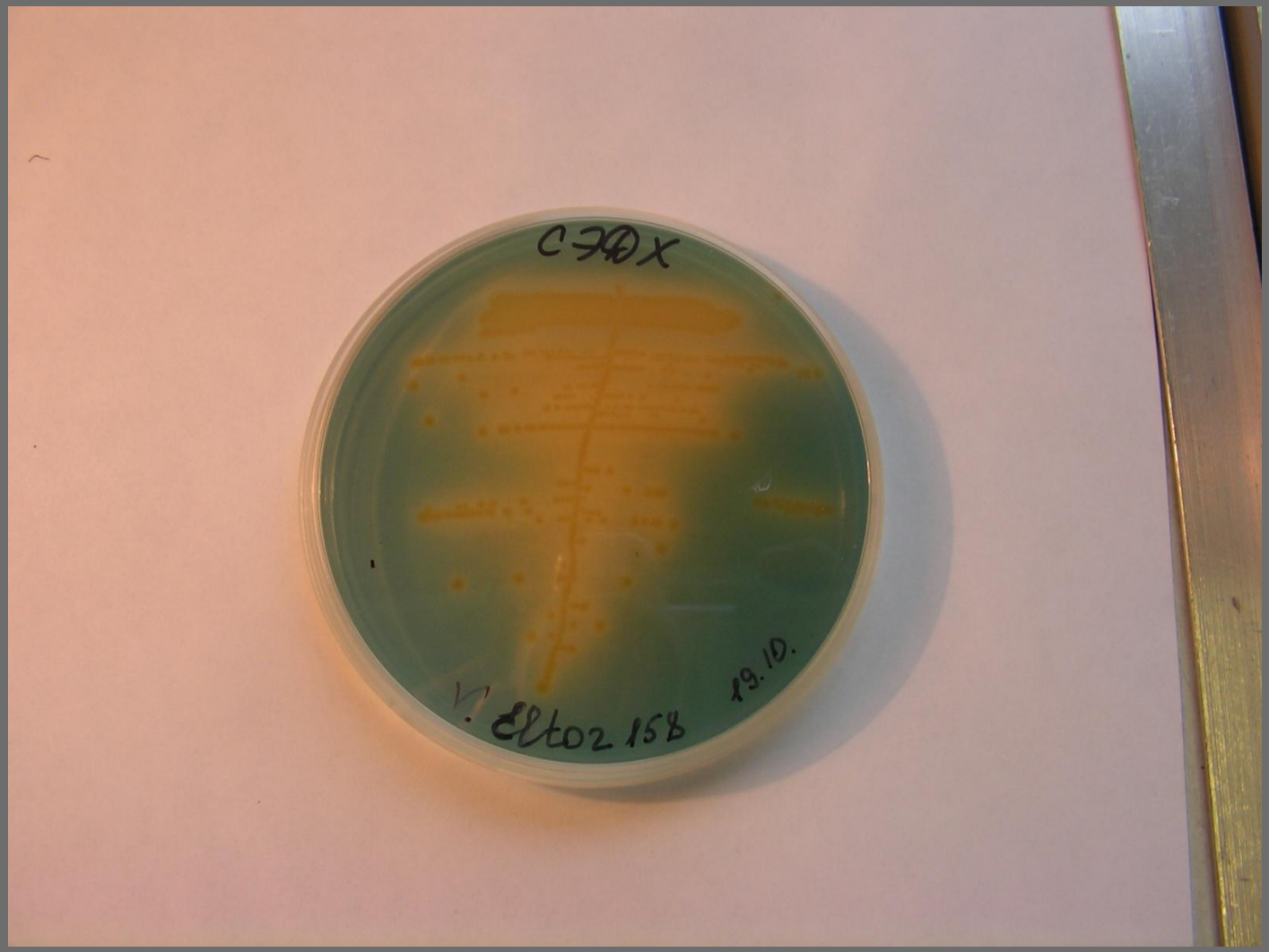
- **Ингибиторы:** высокие концентрации поваренной соли, желчь, теллурит калия, дезоксихолат натрия, красители (генцианвиолет, бриллиантовый зеленый), антибиотики.

Индикаторы – показатели реакции среды

- **Простые -** изменяют цвет в кислой или щелочной среде (лакмусовая настойка, фуксин, индикатор Андреде);
- **Сложные -** обладают более широким диапазоном реакции (индикаторы Кларка): бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, феноловый красный;
- **Комбинированные -** индикатор ВР (смесь водного голубого и розоловой кислоты).

Среда Кристенсена – индикатор феноловый красный

В среде СЭДХ - индикатор бромтимоловый синий (желтое окрашивание колоний при наличии кислой реакции среды)



В среде Симмонса – индикатор бромтимоловый синий (синее окрашивание в условиях щелочной реакции среды)

Питательные среды при выезде

- Сухие среды, приготовляемые без стерилизации (Эндо, Плоскирева, АЦДС, ВСА) или полуфабрикаты (требуют автоклавирования).
- Готовые стерильные среды во флаконах.
- Готовые стерильные среды в чашках.
- Хромогенные среды.
- Системы индикаторных бумаг.
- Коммерческие микротестсистемы.

Коммерческая двухфазная среда для исследования крови

Плотные питательные среды, готовые к посеву

- Система «Enterotube».
- API-системы («Биомерье» Франция), выполненные в виде полосок с контейнерами. Учет по цветным каталогам или с помощью компьютерных программ.

Изучение биохимической активности микробов с использованием api-системы (api 20 E)

Флюорохромная- флуоресцентная среда-ФСБ бульон

Контроль или

Отрицательный результат

Цвет среды сине-зеленый

КОЛИФОРМЫ

β–D галактозидаза

Флюоресценция среды

E. coli

β-D-глюкуронидаза

Тест на индол

99%

E. coli

Триптофаназа

Тест-штаммы

Эталонные культуры, обладающие типичными стабильными свойствами:

- Морфологическими,
- Культуральными,
- Биохимическими,
- Антигенным строением.

Хранятся в лиофильно высушенном состоянии.

Рабочие субкультуры – в 0,3% питательном агаре под слоем вазелинового масла или на скошенном агаре, запаянном в пробирках.

- Для контроля сред для выращивания чумного микроба – штамм I. pestis EV;
- Холерного вибриона – V. cholerae eltor M-878;
- Для контроля ингибирующих свойств среды – Proteus vulgaris19.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. **Питательными –** содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей бактерий.

2. **оптимальное pH –** концентрация водородных ионов, только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества. Норма (pH 7,2-7,4) исключение холерный вибрион (pH 8,5-9,0) и возбудитель туберкулеза (pH 6,2-6,8), продукты жизнедеятельности бактерий могут изменять pH поэтому необходимо добавлять вещества которые будут их нейтрализовать (буферность).

3. **Изотоничность –** осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки в норме соответствует 0,5% раствору натрия хлорида.

4. **Стерильность –** посторонние микроорганизмы препятствуют росту исследуемой культуры.

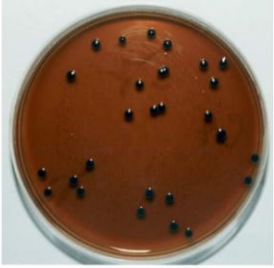
5. **Влажность –** характерно для плотных питательных сред.

6. **Окислительно-восстановительный потенциал –** соотношение веществ отдающих и принимающих электроны, этот потенциал (RH2) показывает насыщение среды кислородом.

Пример: анаэробы размножаются при (RH2) не выше 5, а аэробы - при (RH2) не ниже 10.

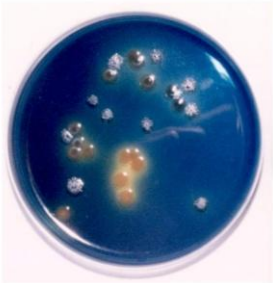
7. **Прозрачность –** удобно наблюдать за ростом микроорганизмов.

СПАСИБО за внимание!



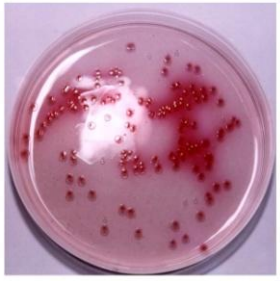
Коринебакагар:
Corinebacterium diphtheriae mitis.

Иерсиниозная среда:
дифференциация *E.coli*, *Y.enterocolitica* и *Y.pseudotuberculosis*.



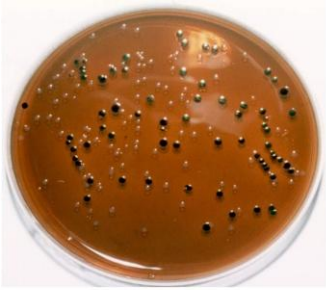
Иерсиниозная среда:
вверху слева - *Y.pseudotuberculosis* - зелено-синие сухие колонии с фестончатым краем;
внизу слева - *Y.enterocolitica* - синие сочные гладкие колонии;
вверху справа - *S.flexneri* - желтые мелкие колонии;
внизу справа - *E.coli* - желтые сочные выпуклые колонии.

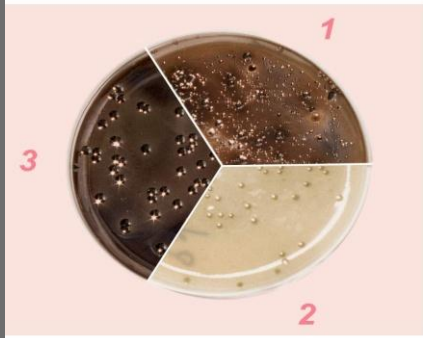
SS-агар:
дифференциация *E.coli* (красные круглые колонии) и *Salmonella spp*. (Бесцветные прозрачные круглые колонии, некоторые, выделяющие сероводород - с темным центром).



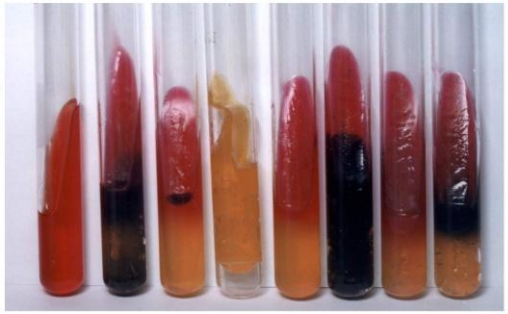
Агар Эндо-ГРМ:
дифференциация *S.connei* (бесцветные или бледно-розовые прозрачные колонии) и *E.coli* - малиновые круглые с металлическим блеском.

Среда Левина-ГРМ:
дифференциация *E.coli* (темно-фиолетовые круглые колонии с металлическим блеском) и *S.flexneri* (бесцветные круглые прозрачные колонии)





Висмут-сульфит-ГРМ агар:
1: *E.coli* (круглые зеленовато-коричневые колонии), *S.typhi* (колонии круглые черные с металлическим блеском).
2: *P. vulgaris*.
3: *S. typhimurium*.



Агар Клиглера-ГРМ:
слева направо
1-исходная среда;
2-*P. mirabilis "Сиднеев"*;
3-*S.typhi "bismuth"*;
4-*E.coli*;
5-*S.sonnei "S-form"*;
6-*S.paratyphi*;
7-*P.inconstans*;
8-*P.vulgaris*.

Агар Кесслера-ГРМ:
слева исходная среда,
в центре - рост *E.coli*,
справа - *S.paratyphi*.

Мюллер-Хинтон агар:
Антибиотикограмма культуры *P.aeruginosa*
(вверху слева - гентамицин,
вверху справа - нетилмицин,
внизу слева - цефтриаксон,
внизу справа - карбенициллин 100 мкг).