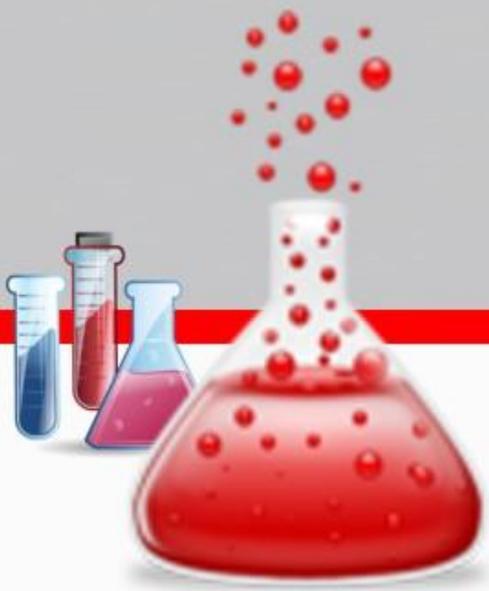


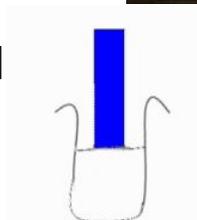
Среды для культивирования бактерий





Основные требования к питательным средам

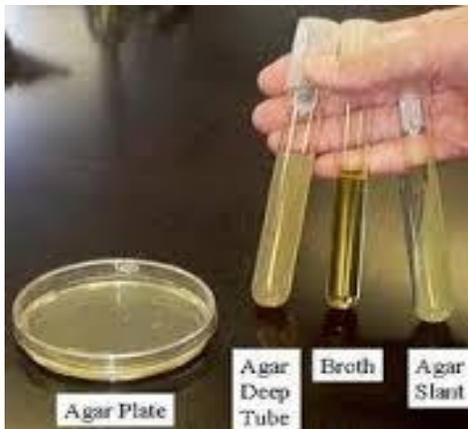
- оптимальное содержание питательных веществ в легкоусвояемой форме (органические источники углерода,
- набор минеральных солей, факторы роста),
- адекватное для соответствующей группы бактерий значение pH,
- определенный окислительно-восстановительный потенциал,
- достаточное содержание воды,
- стерильность



А будешь ругаться - к пальце твоей прислонюсь...



Классификация питательных сред

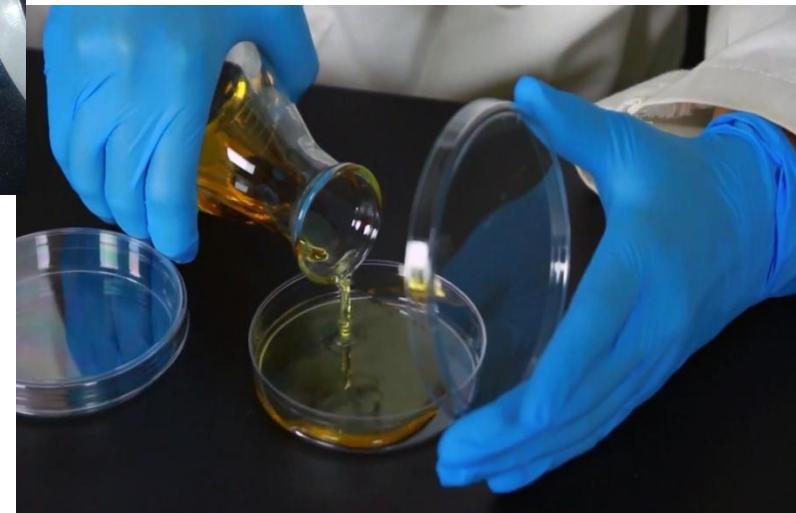


- Питательные среды делят *по консистенции и назначению*.
- В зависимости от *консистенции* различают жидкие (мясопептонный бульон, сахарный бульон), плотные (1-2% мясопептонный агар), полужидкие (0,3-0,9% мясопептонный агар) питательные среды. Для приготовления плотных питательных сред в жидкие среды добавляют 1,5-2% агара – экстракта из морских водорослей, основным компонентом которого является полисахарид агароза. Агар плавится при температуре около 90°C и застывает при температуре около 40°C, 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



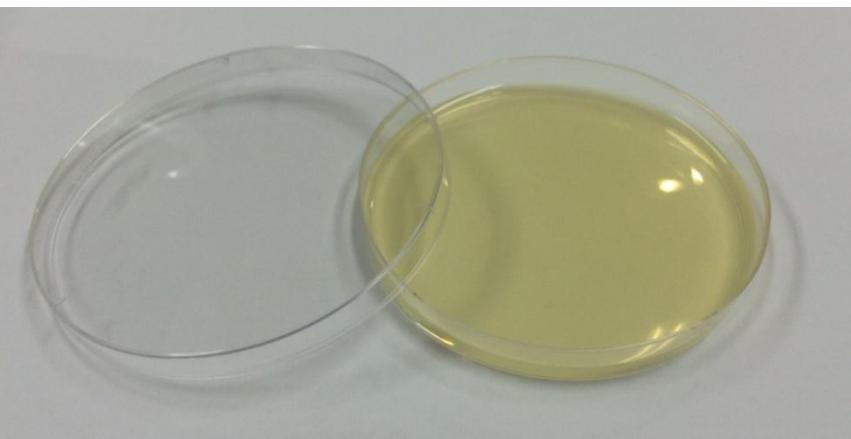
- Для получения готовой среды необходимо взвешиванием отмерить нужное количество порошка, растворить его в воде, нагреванием расплавить находящийся в нем агар, провести стерилизацию, асептически добавить нетермостойкие добавки и разлить в стерильную лабораторную посуду.



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+ натриях.



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)



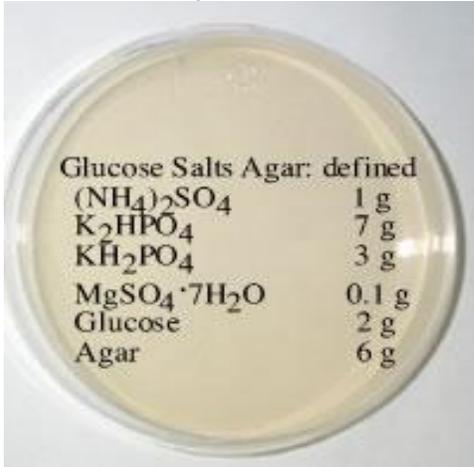
- «Шоколадный» агар – содержит эритроциты, разрушенные нагреванием. Высвобождаемые из них вещества (в том числе гемоглобин и NAD) обеспечивают рост таких микроорганизмов, как *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*.



Селективные (избирательные) питательные среды

- Обеспечивают выделение определенных групп микроорганизмов, подавляя рост сопутствующей микрофлоры. Создание неблагоприятных условий для нежелательных микроорганизмов может достигаться 4 способами.

Минимальные питательные среды



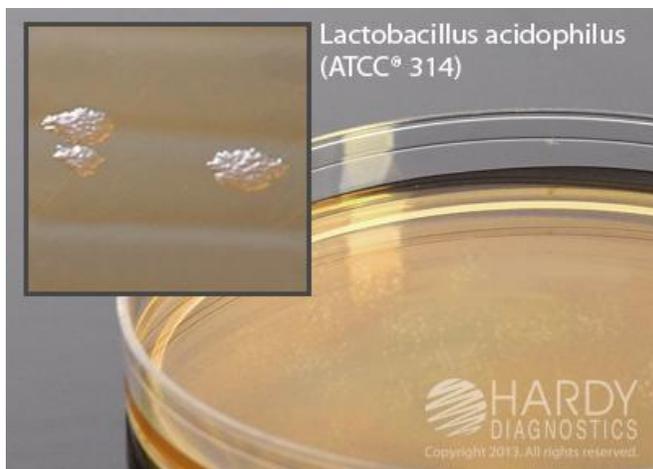
- имеют строго определенный химический состав, что достигается использованием высокоочищенных синтетических компонентов.
- Обычно содержат одно или несколько органических веществ и набор минеральных солей.
- Селективность достигается за счёт нехватки источников энергии, аминокислот или витаминов для 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 M-9, в которой источником энергии и углерода является глюкоза, а азота — NH_4Cl

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 tuberculosis*

- 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 смеси антибиотиков.



■ Солевой агар для *S. aureus*



■ Желчный бульон 20%
Для выделения сальмонелл

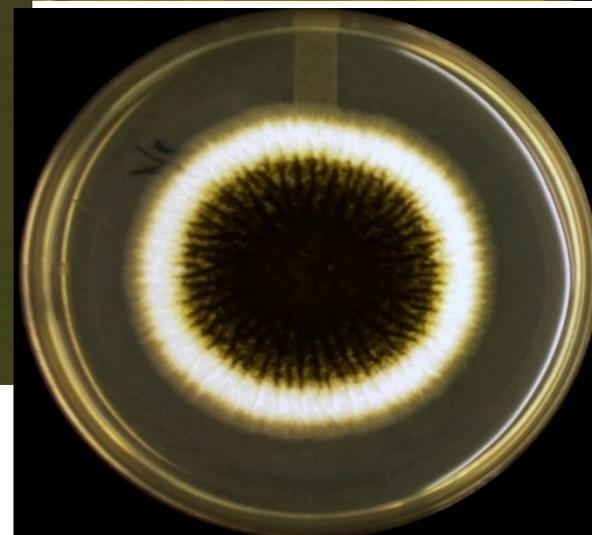


- ЖЕЛЧНЫЙ БУЛЬОН С БРИЛЛИАНТОВЫМ ЗЕЛЕНЫМ 2%
- Среда содержит два ингибитора роста грамположительных и некоторых грамотрицательных микроорганизмов - краситель бриллиантовый зеленый и бычья желчь.

Селективные (избирательные) питательные среды



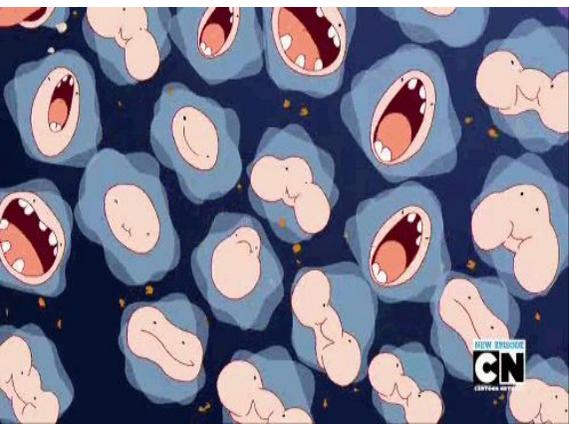
- *Среда Леффлера*
(свернутая сыворотка крови с сахарным бульоном) - эффективна для дифтерийной палочки



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 лежат различные принципы



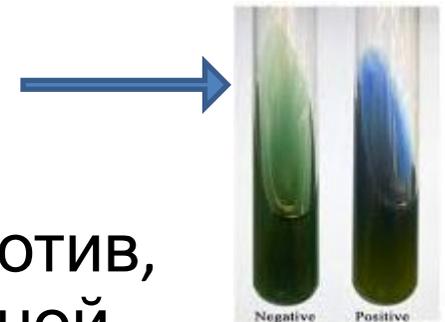
Дифференциально-диагностические среды

- **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.



Среды **Гисса** (МПА, набор углеводов, индикатор)

- Другие субстраты (лимонная кислота, мочевины, аргинин, орнитин, лизин), напротив, могут вызывать **защелачивание** питательной среды при их расщеплении бактериями.

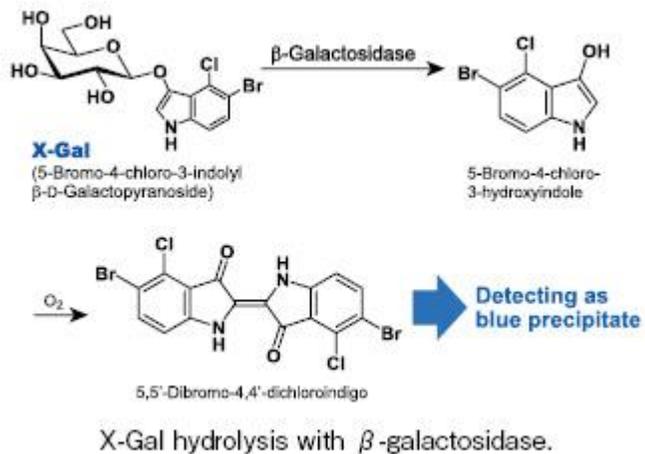


- Соответствующие изменения pH приводят к изменению цвета добавленного в среду вещества индикатора.

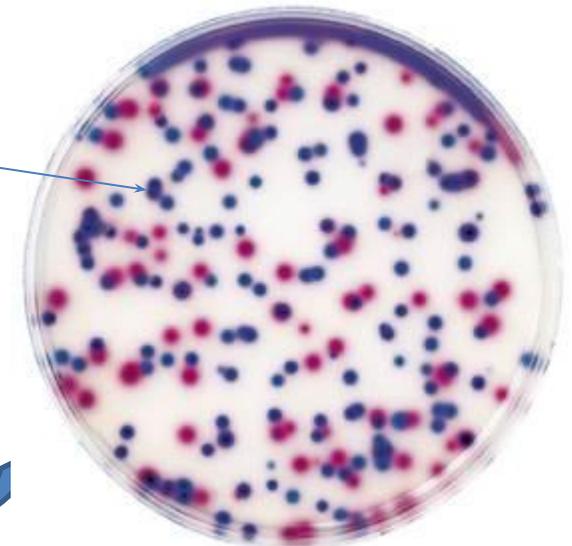
Среда Симмонса для определения способности микроорганизмов утилизировать цитраты

Дифференциально-диагностические среды

- **Среды с хромогенными субстратами** – содержат вещества, которые дают окрашенные продукты при их расщеплении бактериальными ферментами (например, X-Gal расщепляется бета-глюкуронидазами с образованием синего пигмента).
- Принцип действия основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов.
- К таким ферментам относятся, например, бета-D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или бета-D-глюкозидаза

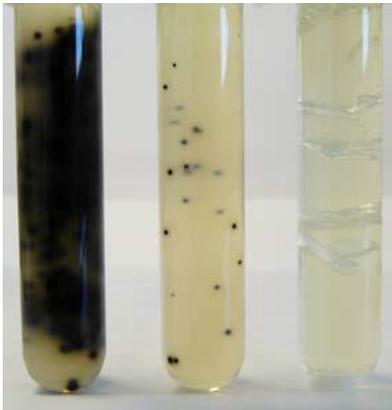


E.coli



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, кластридиум агар



■ На фото рост кластридий на среде Вильсон-Блэр

- 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 Клиггера:



uninoculated
control

Pseudomonas
aeruginosa

Shigella sonnei

Salmonella
typhi

Escherichia
coli

Proteus
mirabilis

ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain

содержит 2% глюкозу,
0.1% глюкозу,
тиосульфат натрия и
сульфат железа,
индикатор фенол рот.

Посев по поверхности и
уколом в столбик агара.

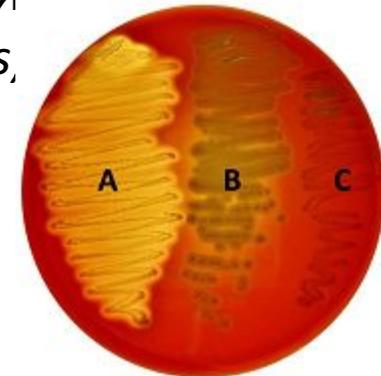
При ферментации
только глюкозы –
желтый столбик,
скошенная часть не
меняет окраску.

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 (Na_2SO_3)**,
- ❖ 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 (ЕМВ-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

