

Питательные среды и микробиологическое исследование - Г. И. Кац

Микробиологическое исследование - это выделение чистых культур микроорганизмов, культивирование и изучение их свойств. Чистыми называют культуры, состоящие из микроорганизмов одного вида. Они нужны при диагностике инфекционных болезней, для определения видовой и типовой принадлежности микробов, в исследовательской работе, для получения продуктов жизнедеятельности микробов (токсинов, антибиотиков, вакцин и т. п.).

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты - питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют средами для культивирования.

Питательные среды

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов.

Требования, предъявляемые к средам

Среды должны соответствовать следующим требованиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства среды (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среду вносят факторы роста - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

Внимание! Микроорганизмы, как все живые существа, нуждаются в большом количестве воды.

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов - рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2-7,4). Исключения составляют холерный вибрион - его оптимум

находится в щелочной зоне (рН 8,5-9,0) и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2-6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты; обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки; т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других - низкий. Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы - при RH_2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8-1,2 г/л аминного азота NH_2 , т. е. суммарного азота аминогрупп аминокислот и низших полипептидов; 2,5-3,0 г/л общего азота N; 0,5% хлоридов в пересчете на натрия хлорид; 1% пептона.

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

Классификация сред

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

В настоящее время предложено огромное количество сред* в основу классификации которых положены следующие признаки.

1. Исходные компоненты. По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. В настоящее время разработаны среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непригодными: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, сгустками крови и др. Несмотря на то что состав питательных сред из натуральных продуктов очень сложен и меняется в зависимости от исходного сырья, эти среды нашли широкое применение. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

2. Консистенция (степень плотности). Среда бывает жидкая, плотная и полужидкая. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар - полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80-100° С, застывает при 40-45° С.

Желатин - белок животного происхождения. При 25-30° С желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при рН ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество - при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.

3. Состав. Среда делится на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. Назначение: а) основные (общеупотребительные) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов. Это вышеупомянутые МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода;

б) специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах. Например, для культивирования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмо- и менингококков - сыворотку крови, для возбудителя коклюша - кровь;

в) селективные (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Так, соли желчных кислот, подавляя рост кишечной палочки, делают среду селективной для возбудителя брюшного тифа. Среда становится селективной при добавлении к ней определенных антибиотиков, солей, изменении рН.

Жидкие селективные среды называют средами накопления. Примером такой среды служит пептонная вода с рН 8,0. При таком рН на ней активно размножается холерный вибрион, а другие микроорганизмы не растут;

г) дифференциально-диагностические среды позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности, например среды Гисса с углеводами и индикатором. При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды;

д) консервирующие среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов. Пример такой среды - глицериновая смесь, используемая для сбора испражнений при исследованиях, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.

Рецепты приготовления некоторых сред приведены в конце следующего раздела и во второй части учебника.

Домашнее задание.

Написать конспект, используя данную лекцию (выучить материал и ответить письменно на контрольные вопросы и прислать мне на электронную почту)

Контрольные вопросы

1. Каким требованиям должны удовлетворять питательные среды?
2. Как классифицируют среды по исходным компонентам?
3. Какие вещества служат для уплотнения сред?
4. Какие среды являются простыми или общеупотребительными и для чего их применяют?
5. Какие среды называют сложными, что служит их основой?
6. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении других?
7. На каких средах изучают ферментативную активность микробов?

