Классификация Питательных сред

При составлении питательных сред для микроорганизмов необходимо учитывать их потребность в элементах питания. По составу питательные среды подразделяются на две группы: естественные (натуральные) и синтетические. Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Основой таких сред являются различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, овощи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство из них используется в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в этих средах имеются, обычно, все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а с другой стороны, выяснить, какие вещества образуются по ходу развития микроорганизмов. Это связано с тем, что состав естественных сред очень сложен; кроме того, он не является постоянным, так как существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды неопределенного состава используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и для диагностических целей. К числу сред неопределенного состава относят и так называемые полусинтетические среды. В их состав наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Синтетические среды — это такие среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды следует готовить на дистиллированной воде. Для разработки синтетических сред, обеспечивающих нормальный рост изучаемого микроорганизма или максимальный биосинтез какого-либо продукта его жизнедеятельности, необходимо знать особенности обмена веществ данного организма и его потребности в источниках питания. В настоящее время в распоряжении микробиологов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам сложным средам неизвестного состава. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть и довольно простыми по составу. Синтетические среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение в соответствующие продукты обмена. С. Н. Виноградским в практику микробиологии введены элективные (избирательные) среды для определенных групп микроорганизмов. Эти среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодны или совсем не пригодны для развития других. Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав среды, ее активную кислотность, условия аэрации, температуру и др.), при которых будут развиваться лишь микроорганизмы этой группы. Это позволяет вести различные биологические процессы в лаборатории и в производстве без предварительной стерилизации среды. Такие среды применяются главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания, для получения накопительных культур. Понятие «элективные среды» входит в более широкое понятие «элективные условия». Питательные среды применяют различной консистенции: жидкие, плотные, полужидкие. Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения их в чистую культуру и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя 1,5—2,5% агар-агара или 10—15% желатины. При приготовлении полужидких сред вносят агар-агар в количестве 0,1—0,2%. По назначению среды разделяют на элективные и дифференциально-диагностические. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилоккоков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры. Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды. В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить клоны, сбраживающие лактозу от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный (пептонный) агар, углевод и основной фусин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развививается красная окраска соответствующих колоний. Среда с эозином и метиленовым синим (среда Левина) в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий и исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Подобные изменения окраски происходят потому, что красители присутствуют в среде не в виде самостоятельных соединений, а в виде комплексов с веществами питательной среды. При низких значениях рН эти комплексы выпадают в осадок, исходные же красители в этих условиях растворимы, при больших рН комплексы красителей бесцветны, тогда как метиленовый синий приобретает синюю окраску. Данная среда позволяет дифференцировать бактерии рода Escherichia от бактерий рода Proteus.

**Состав питательных сред.**

**Агар-агар** — растительный коллоид, получаемый из некоторых морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды с ничтожным содержанием азотистых веществ. Желатина — кислый азотсодержащий продукт, добываемый путем выварки костей и хрящей. В качестве плотных питательных сред широко применяют также гелевые пластины, введенные в микробиологическую практику С. Н. Виноградским. Для выращивания микроорганизмов, использующих органические формы азота, часто употребляют мясопептонные среды: **мясопептонный бульон**, мясопептонный агар и мясопептонную желатину. Мясопептонный бульон (МПБ). Для приготовления мясо-пептонных сред используют мясной бульон, который получают так: 500 г мелко изрубленного свежего мяса без костей, жира и сухожилии заливают в эмалированной кастрюле 1 л водопроводной воды, нагретой до 50°С, и оставляют настаиваться 12 ч при комнатной температуре или 1 ч при 50—55°С. Мясо отжимают, экстракт процеживают через марлю со слоем ваты, кипятят в течение 30 мин для свертывания коллоидных белков и фильтруют дважды (первый раз через марлю с ватой, второй — через бумажный фильтр). Фильтр доливают водой до 1 л, разливают в колбы, закрываю! ватными пробками и стерилизуют при 120°С 20 мин (пробки колб закрывают сверху колпачками из бума ги). Ватные пробки должны быть плотными, так как они являются фильтром, препятствующим проникновению бактерий из воздуха после стерилизации. Мясной бульон может быть использован в любое время для приготовления соответствующих сред. Если их готовят сразу, то предварительная стерилизация излишня. Нередко в лабораторных условиях мясной настой кипятят вместе с мясом, а затем мясо отжимают. Бульон получается хорошего качества. Если желательно иметь мясной бульон особо высокой питательности, во время настаивания мяса с водой добавляют немного пепсина и подкисляют бульон соляной кислотой. Пепсин дополнительно гидролизует белковые соединения мяса, и количество усвояемых бактериями питательных веществ возрастает. Мясо можно заменить мясным экстрактом, беря его по 5 г на 1 л среды. Для приготовления мясопептонного бульона к 1 л мясного бульона добавляют 5—10 г пептона (пептон — первый продукт гидролиза белка с высокой молекулярной массой) для повышения калорийности среды и 5 г поваренной соли с целью создания осмотической активности. Среду нагревают до растворения пептона, постоянно помешивая. Затем устанавливают нейтральную или слабощелочную реакцию среды, приливая 20%-ный раствор NagCOa (до посинения влажной красной лакмусовой бумажки; при этом фенолфталеин еще не показывает щелочную реакцию — при добавлении его к среде в фарфоровой чашке розовая окраска не выявляется). Удобно использовать индикатор бромтимолблау. 1—2 капли его вносят стеклянной палочкой в фарфоровую чашку и добавляют каплю бульона. В нейтральной среде бромтимолблау бутылочно-зеленый, в кислой — желтый, в щелочной — синий. После установления реакции среду снова кипятят 5—10 мин и белки, свернувшиеся от изменения реакции, отфильтровывают через бумажный фильтр без осветления бульона или осветлив его белком. Прозрачный Мясо-пептонный бульон разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 120°С в течение 20 мин. **Мясо-пептонный агар** (МПА). К 1 л мясо-пептонного бульона добавляют 15—20 г мелко нарезанного агар-агара. Среду нагревают до растворения агара (температура плавления его 100°С, застывания —40°С),устанавливают слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na2COa и через воронки разливают в пробирки (но 10 мл для разливок в чашки — агар столбиком и по 5 мл для получения скошенного, наклонного агара). При разливе агара необходимо следить затем, чтобы края пробирки были сухими, иначе пробки прилипают к стеклу. Пробирки со средой стерилизуют в автоклаве при 120°С в течение 20 мин. **Мясо-пептонная желатина** (МПЖ). В 1 л мясопептонного бульона помешают 100—150 г желатины. Температура плавления зависит от процентного содержания в среде. 10%-ная желатина плавится при 24°С, 15%-пая — при 25°. В летнее время среды готовят, добавляя 15% желатины. После растворения желатины при осторожном нагревании в среде устанавливают слабощелочную реакцию (как и для МПБ и МПА), кипятят в течение 5мин, затем охлаждают -до 40—50°С. Одновременно яичный белок взбивают с небольшим количеством воды, вливают его в охлажденную желатиновую среду, хорошо взбалтывают и снова нагревают. Среда после выпадения белков становится прозрачной. Ее фильтруют через горячую воронку, разливают в пробирки и стерилизуют в кипятильнике Коха текучим паром, прогревая среду по 30 мин через 24 ч 3 раза.

**Картофельный агар** . 200 г очищенного и промытого водой картофеля нарезают ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды, варят 30 мин. Отвар фильтруют через вату и доводят до первоначального объема. К полученной жидкости прибавляют 2% агара, кипятят до его растворения и устанавливают нейтральную реакцию среды (рп 7,0). Среду стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин**. Пивное сусло**. Зерна ячменя замачивают в холодной воде и проращивают при 35°С. После того как ростки будут вдвое больше длины зерна, последнее высушивают до воздушно-сухого состояния (можно при слабом подогревании) и получают солод. Для приготовления сусла солод крупно размалывают и 250 г его берут на 1 л воды. Смесь подогревают при 57°С (для лучшего выделения фермента амилазы) до исчезновения реакции на крахмал (синее окрашивание с йодом). Пробы на осахаривание крахмала проводят в фарфоровой чашке в капле жидкости. Сусло процеживают через вату, затем фильтруют через бумажный фильтр. Такое сусло содержит 10— 20% сахара. Определив его содержание по плотности раствора с помощью сахариметра, сусло разбавляют водой до концентрации сахара 6—8%, стерилизуют при 115°С (давление 0,5 атм) в течение 30 мин. Готовое сусло можно получить на пивоваренном заводе. **Сусло-агар**. К приготовленному суслу добавляют 2,5—3% агара, кипятят до его расплавления, фильтруют через вату и стерилизуют таким же способом, как пивное. **Обезжиренное молоко**. Для приготовления питательных сред употребляют снятое молоко, так называемый обрат (жир в молоке неблагоприятно влияет на рост некоторых микроорганизмов). Обрат получают сепарированием молока, нагретого до 34°С. Жир можно удалять и при отстаивании молока. При стерилизации молока следует учитывать, что его нельзя длительное время выдерживать в автоклаве, так как лактоза (молочный сахар), содержащаяся в молоке, может карамелизоваться. Обезжиренное молоко разливают в стерильные пробирки и выдерживают при 115°С (давление 0,5 атм) 15 мин. Перед стерилизацией кислотность обрата не должна превышать 22° Тернера, иначе молоко свернется. После стерилизации его выдерживают трое суток в термостате при 30°С, чтобы спровоцировать развитие спорообразующих и других стойких к нагреванию форм. Через 3 дня каждую пробирку с молоком просматривают и пробирки, в которых развились микроорганизмы, выбраковывают. При стерилизации в автоклаве иногда наблюдается побурение молока вследствие карамелизации молочного сахара и пептонизации казеина. При длительной стерилизации на дно пробирки выпадает осадок казеина, который может частично пептонизироваться. Перегретое побуревшее молоко в качестве среды использовать нельзя. Дрожжевые среды. **Дрожжевая вода**. 50—100 г сухих дрожжей размешивают в 1 л воды, кипятят 10 мин, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют текучим паром по полчаса в течение трех дней ежедневно. **Дрожжевой автолизат**. 200 г прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, добавляют 2 г Na2HPO4, 1 н. раствор NaOH (до рН 6,1) и 5 мл хлороформа, выдерживают при 37°С двое суток, доводят до рН 7,4, кипятят 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют при 115°С полчаса. **Дрожжевой экстракт**. 1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, смесь кипятят 1 ч, трижды отфильтровывают через бумажный фильтр и стерилизуют при 115°С 30 мин. **Бобовый отвар**. 50 г фасоли (лучше белой) заливают 1 л водопроводной воды и варят до готовности так, чтобы бобы не разварились. Полученный отвар фильтруют через вату, добавляют к нему 10 г сахара и доводят до первоначального объема. Устанавливают слабощелочную реакцию среды, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при давлении пара 1,5 атм в течение 30 мин.

**Элективное культивирование.**

Познанием многообразия микроорганизмов мы обязаны двум обстоятельствам. Некоторые микроорганизмы уже сравнительно давно привлекли к себе внимание вследствие того, что они образуют колонии или скопления или же вызывают какие-либо заметные изменения в окружающей среде. Многие из таких, легко обнаруживаемых микроорганизмов поддаются прямому выделению; относите л ьпо нетрудно подобрать условия, которые обеспечивали бы их рост. Существуют, однако, и многие другие микроорганизмы (различных физиологических типов), ставшие доступными для исследования лишь после того, как Виноградский и Бейерипк разработали технику накопительных культур. И в принципе и на практике метод очень прост. Подбором ряда факторов (источники энергии, углерода и азота; акцептор электронов; свет; температура; рН и т. п.) создают определенные условия и инокулируют среду смешанной популяцией, какая имеется, например, в почве или в иле. В такой среде наиболее хорошо приспособленный к пей тип микроорганизмов растет и вытесняет все остальные, сопутствующие, организмы. Посредством многократных пересевов в жидкую среду такого же состава и рассева по такой же плотной среде можно без труда выделить накопленный штамм. Частый пересев с жидкой среды на жидкую предотвращает рост сопутствующих организмов, которые могли бы использовать продукты выделения или даже автолиза клеток первичной культуры и расти за счет них. Прекрасным материалом для инокуляции служат пробы из тех мест, где уже имеется «естественное обогащение». Так, можно выделять микроорганизмы, использующие окись углерода, из сточных вод газовых заводов; микроорганизмы, использующие гемоглобин, — из сточных вод боен и бактерии, окисляющие углеводороды, — из нефтеносных пород, из почв, загрязненных нефтью, и из нефтяных отстойников. Метод накопительных культур позволяет выделять микроорганизмы с любой комбинацией потребностей в питательных веществах при условии, разумеется, что искомый тип вообще существует в природе. Для крайне специализированных микроорганизмов особенно легко создать элективные условия. Так, минеральная среда, не содержащая связанного азота, на свету строго избирательна для "сине-зеленых водорослей, фиксирующих N2. Если ту же среду дополнить органическим источником энергии и углерода, то на ней в темноте в аэробных условиях будет развиваться Azotobacter, а при исключении доступа воздуха — Clostridium. Для успешного получения накопительных культур требуется ограничиться удовлетворением минимальных потребностей только того микроорганизма, который хотят выделить. Если, например, хотят выделить бактерии, способные окислять метан или водород с нитратом или сульфатом в качестве акцептора водорода, то следует позаботиться об исключении доступа кислорода, иначе будут доминировать аэробные формы, окисляющие метан или водород. Для отбора можно также использовать устойчивость или толерантность микроорганизмов к кислотам и щелочам, к высоким температурам пли излучению. Нередко наряду с «положительной» селекцией проводится и «отрицательная»— при помощи избирательно действующих ингибиторов. На питательной среде, содержащей азид, в аэробных условиях растут, например, молочнокислые бактерии, а рост других аэробных микроорганизмов подавляется. Азид, цианид и H2S оказывают избирательное действие па те аэробные организмы, в дыхании которых участвуют цитохромы. В медицинской диагностике пользуются избирательным подавлением для обнаружения Corynebacterium diphtheriae (применение питательных сред, содержащих теллурит) и патогенных Enterobacteriaceae (агаризованные среды с добавлением висмута). В посевном материале могут присутствовать различные штаммы с одинаковым типом обмена веществ, отличающиеся друг от друга лишь незначительно, например лишь по оптимальному значению рН или по скорости роста. Если для получения накопительной культуры использовать такой материал, то доминировать будет наиболее адаптированный к данным условиям или наиболее быстро растущий штамм, все же остальные будут подавлены и выделить их не удастся. Поэтому в тех случаях, когда хотят выделить максимальное число штаммов, растущих при определенных элективных условиях, посев следует проводить непосредственно в чашки. На плотных элективных средах штаммы, которым условия благоприятствуют, образуют колонии. При достаточно большом расстоянии между колониями конкуренция за питательные вещества не может иметь места; штаммы, растущие более медленно, не подавляются растущими быстрее, так что те и другие могут быть выделены раздельно. В этой обзорной таблице объединены данные относительно получения накопительных культур у микроорганизмов с разными типами обмена веществ. Чистую культуру микроорганизма (последний этап выделения) получают обычно па (или в) плотной питательной среде. Процедура начинается с отделения от популяции клеток одной-единственной клетки. Обязательное требование состоит в том, чтобы вырастающая из клетки колония оставалась изолированной от других клеток или колоний. Аэробные бактерии выделяют либо по методу Коха — рассевая суспензию по поверхности среды в чашках, либо, что легче, размазывая каплю платиновой петлей по агаризованной среде. Анаэробные бактерии суспендируют в расплавленном агаре с температурой 45°С и проводят инкубацию без доступа воздуха. Тщательное отделение одной колонии, повторное суспендирование в жидкости и повторное нанесение мазка или разведение в агаре позволяют получать чистые культуры большинства микроорганизмов.