**Лекция 8**

 **Тема Питательные среды.**

План:

 1.Классификация питательных сред

2.Требования к питательным средам

3.Классификация питательных сред.

3.Этапы приготовления питательных сред

4.Контроль качества питательных сред.

Полный конспект лекции.

Питательные среды являются основой микробиологи­ческой работы, и их качество нередко определяет резуль­таты всего исследования. Среды должны 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 органогенов и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

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). Исключение 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;

1. 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;
2. быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);
3. 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 RH2. Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других — низкий. Например, анаэробы размножаются при RH2 не выше 5, а аэробы — при RH2 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 NH2, 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 непищевыми: 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). Среды бывают жидкие, плотные и полужидкие. Плотные и полу­ жидкие 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 селикагелем.

1. Состав. Среды делят 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.
2. 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) элективные (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 элективной для возбудителя брюшного тифа. Среды ста­новятся элективными при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН.

Жидкие элективные 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;

  **Этапы** **приготовление сред**

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке ее в ржавых кастрюлях. Лучше всего пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Большие количества среды (десят­ки и сотни литров) готовят в специальных варочных котлах или реактора. Перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить.

Этапы приготовления сред:

1) варка;

2) установление оптимальной величины рН;

3) осветление;

4) фильтрация;

5) разлив;

6) стерилизация;

7) контроль.

Установление рН сред ориентировочно производят с помощью индикаторных бумажек. Для точного определения рН пользуются потенциометром, применяя стек­лянные электроды в соответствии с инструкцией или компаратором (аппарат Михаэлиса), состоящим из штатива с гнездами для пробирок и набора.

 При стерилизации рН сред снижается на 0,2, поэтому для получения среды с рН 7,2—7,4 ее сначала готовят с рН 7,4 — 7,6.

Осветление сред производят, если при варке они мутнеют или темнеют. Для осветления в среду, подогре­тую до 50 °С, вливают белок куриного яйца, взбитый с двойным количеством воды, перемешивают и кипятят. Свертываясь, белок увлекает в осадок взвешенные в среде частицы. Таким же способом можно вместо яичного белка использовать сыворотку крови (20—30 мл на 1 л среды).

Фильтрацию жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или через матерчатые фильтры.

 Посуду со средой обычно закрывают ватно-марлевыми пробками, поверх которых надевают бумажные колпачки. Важно, чтобы при разливе среда не смачивала края посуды, иначе к ним могут прилипнуть пробки. К каждо­му сосуду обязательно прикрепляют этикетку с названием среды и датой ее приготовления.

 Стерилизация. Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в ее рецепте. Примерная схема режима стерилизации сред приведена в таблице.

Жидкие среды с углеводами, белками или витаминами лучше стерилизовать с помощью бактериальных фильтров.

**Контроль готовых сред:**

**а)** для контроля стерильно­сти среды ставят в термостат на 2 сут. после чего просматривают. Если на средах не появятся признаки роста, их считают стерильными и передают для химиче­ского контроля по нескольку образцов каждой серии;

 **б)** химический контроль: окончательно устанавливают рН, содержание общего и аминного азота, пептона, хлоридов (их количество должно соответствовать указан­ному в рецепте). Химический контроль сред производят в химической лаборатории в) для биологического контроля нес­колько образцов среды засевают специально подобранны­ми культурами микроорганизмов, и по их росту судят о питательных (ростовых) свойствах среды. К готовой среде прилагают этикетку и паспорт, в котором указывают название и состав среды, результаты контроля и др.

Хранят среды при комнатной температуре в шкафах, желательно специально для них предназначенных. Неко­торые среды, например, среды с кровью и витаминами, хранят в холодильник.

Отечественная промышленность выпускает сухие сре­ды разного назначения: простые, элективные, дифферен­циально-диагностические, специальные. Это порошки во флаконах с завинчивающимися крышками. Хранят сухие среды в темном месте плотно закрытыми — они гигроско­пичны. В лаборатории из порошков готовят среды по прописи на этикетке.

Преимущество сухих сред по сравнению со средами, изготовленными в лаборатории, — стандартность (их выпу­скают большими партиями), простота приготовления, де­лающая их доступными в любых (даже походных) услови­ях, стабильность, экономичность. Важно, что их можно готовить из заменителей мяса: гидролизата казеина, фиб­рина, кильки и даже белковых фракций микробных клеток (сарцин).

**Контрольные вопросы для закрепления:**

 1.Классификация питательных сред

2.требования к питательным средам

3.этапы приготовления питательных сред

4.хранение. питательных сред

5.Контроль качества питательных сред.