

Питательные среды для  
медицинской микробиологии.  
Методы и техники посевов  
микроорганизмов

# Метаболизм бактерий -

- совокупность двух противоположных, но взаимосвязанных процессов — *катаболизма*, или энергетического метаболизма, и *анаболизма*, или пластического (конструктивного) метаболизма.
- У прокариот, так же как у эукариот, в процессе ферментативных *катаболических реакций* происходит выделение энергии, которая аккумулируется в молекулах АТФ.
- В процессе ферментативных *анаболических реакций* эта энергия расходуется на синтез многочисленных макромолекул органических соединений, из которых в конечном итоге строятся составные части микробной клетки.

# Типы питания бактерий

Источник питания	Группы микроорганизмов
1. Углерод	Автотрофы Гетеротрофы
2. Энергия	Фототрофы Хемотрофы
3. Доноры электронов	Литотрофы Органотрофы

Таблица 1

Приблизительный элементарный состав бактериальных клеток (Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм, 1979)

№	Элементы	Содержание, % от сухого вещества	№	Элементы	Содержание, % от сухого вещества
1	Углерод	50	7	Калий	1
2	Кислород	20	8	Натрий	1
3	Азот	14	9	Кальций	0,5
4	Водород	8	10	Магний	0,5
5	Фосфор	3	11	Хлор	0,5
6	Сера	1	12	Железо	0,2
				Все остальные элементы	~0,3

# Источники углерода и азота

В микробиологии источником **органических веществ** являются:

- 1. Мясной экстракт, настой - продукты специальной обработки мяса животных
- 2. Пептон – продукт ферментативного (пепсин, трипсин) гидролиза белков мяса
- 3. Рыбный гидролизат (ГРМ)
- 4. Дрожжевой автолизат и гидролизат
- 5. Казеин – фосфорсодержащий белок молока – гидролизат
- 6. Гидролизаты растительного происхождения (соевый)
- 7. Другие продукты

# Факторы роста бактерий

- аминокислоты,
- пуриновые и пиримидиновые основания,
- липиды,
- витамины,
- железопорфирины (гем)
- и другие соединения.

# Питательные среды. Состав

- **Натуральные** – состоят из продуктов животного или растительного происхождения и имеют неопределенный химический состав. Например: овощные и фруктовые соки, животные ткани, кровь, молоко, яйца и т.д. (МПА, МПБ).
- **Полусинтетические** – в состав входят соединения известной химической природы и вещества неопределенного состава. Например: МПБ с глюкозой, среда Эндо, среда Сабуро.
- **Синтетические** – содержат только химически чистые соединения в точных концентрациях. Применяют в лабораторных экспериментах. Например: среда Чапека, Омелянского, Ушинского и т.д.

## Среда Чапека

Вода водопроводная . . . . .	1000 мл
NaNO <sub>3</sub> . . . . .	2 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	1 г
KCl . . . . .	0,5 г
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,5 г
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	0,01 г
Сахароза . . . . .	30 г

## Среда Омелянского

Вода дистиллированная . . . . .	1 л
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	1 г
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	1 г
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,5 г
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	0,1 г
NaCl . . . . .	Следы
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	Следы

К этой среде добавляют 5 г углевода или солей органической кислоты также тот или другой индикатор (азолитмин, бромтимол-блеу).

## Среда Ушинского

Вода дистиллированная . . . . .	1 л
Глицерин . . . . .	30–40 г
NaCl . . . . .	5–7 г
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	0,1 г
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,2–0,4 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	2–2,5 г
Аммоний молочнокислый . . . . .	6–7 г
Аспарагин . . . . .	3–5 г

# Питательные среды.

## Назначение

- **Универсальные** (общего назначения)- пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и применяются как основа для специальных питательных сред. Примеры: МПБ, МПА, среда Хоттингера, ГРМ, тиогликолевая среда.
  - **Специальные** применяют в тех случаях, когда микроорганизмы не растут на простых средах. К ним принадлежит кровяной, сывороточный агар, сывороточный бульон, асцитический бульон, асцит-агар и другие.
1. **Элективные среды** - на них одни микроорганизмы растут быстрее и более интенсивно, чем другие виды бактерий. Например, 1 % щелочная пептонная вода является элективной средой для холерных вибрионов, среды Ру и Леффлера – для возбудителей дифтерии.
  2. **Селективные** - благодаря селективным добавкам (желчь, краски, антибиотики и др.) способны подавлять развитие одних видов микроорганизмов, но не влияют на другие виды. Примеры: среда Мюллера является селективной для тифо-паратифозных бактерий, фуразолидоно-твиновый агар – для коринебактерий и микрококков. Добавление антибиотиков в состав сред делает их селективными для грибов (напр. среда Сабуро и др.).



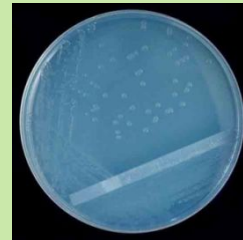
# Питательные среды.

## Назначение

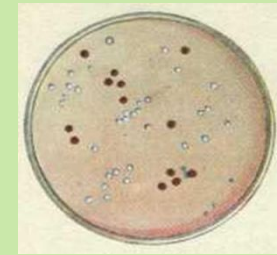
**3. Дифференциально-диагностические** - группа сред, которые позволяют определить биохимические свойства микроорганизмов и провести их дифференциацию. Они разделяются на среды для определения протеолитических, пептолитических, сахаролитических, гемолитических, липолитических, редуцирующих свойств (среды Эндо, Левина, Плоскирева, Гисса).



Среды  
Гисса



Среда  
Левина



Среда  
Плоскирева

**4. Консервирующие (транспортные)-**

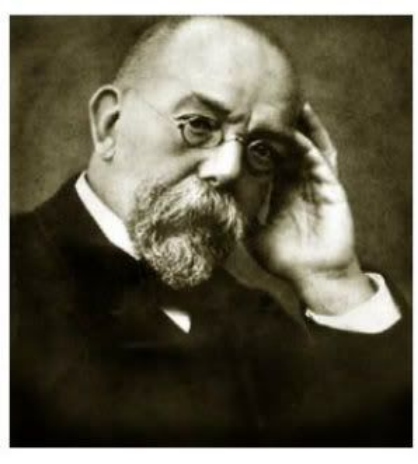
предназначены для сохранения жизнеспособности микроорганизмов от момента взятия биоматериала до посева для диагностики



# Категории питательных сред по консистенции:

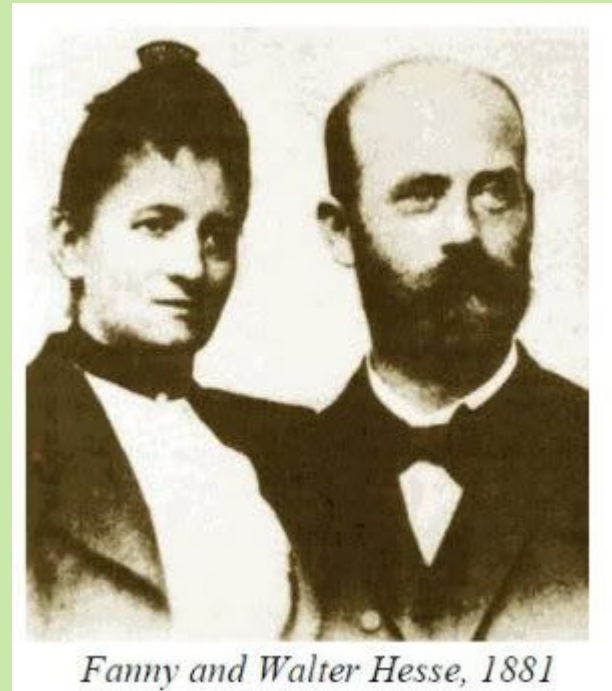
- **Жидкие** (бульоны) – изучение физиолого-биохимических особенностей и накопление биомассы микроорганизмов
- **Полужидкие** (1% агара) – хранение культур и культивирование анаэробов
- **Плотные** (3-5% агара)– выделение чистых культур, накопление, количественный учет, изучение культуральных свойств, антагонистические взаимоотношения
- **Сыпучие** – хранение посевного материала в промышленности (пшено, отруби)
- **Сухие** – выпускаются промышленностью для приготовления питательных сред

# Уплотнители питательных сред



Роберт Кох  
(1843-1910)

Роберт Кох предложил использовать желатин для того, чтобы превращать питательный бульон в плотную массу.  
Недостаток: плавится при  $T=25^{\circ}\text{C}$ .



*Fanny and Walter Hesse, 1881*

Вальтер Хессе (1846 - 1911)  
В. Хессе предложил использовать агар-агара в качестве уплотнителя среды для культивирования микроорганизмов.



# Агар-Агар



Водоросли *Gracilaria* и *Gelidium* - два основных источника для коммерческого производства агара



Сухие пластинки агара-агара.  
Плавится при  $T=80-100^{\circ}\text{C}$ ,  
застывает при  $T=37-40^{\circ}\text{C}$

# Транспортная система со средой Стюарта

- Среда Стюарта представляет собой полужидкий, бедный питательными веществами субстрат для сохранения и транспортировки широкого спектра патогенных микроорганизмов, таких, как *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Trichomonas vaginalis*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* и др. Наиболее требовательные микроорганизмы сохраняются в данной среде более суток, прочие – до нескольких дней.
- Наличие в среде тиогликолата подавляет ферментативную активность бактерий, а отсутствие азота предотвращает их размножение.



Натрия тиогликолят	1,00 г/л
Натрия глицерофосфат	10,00
Кальция хлорид	0,10
Метиленовый синий	0,002
Агар-агар	3,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,4 ± 0,2

# Транспортная система со средой Кери Блэйр

- Транспортная среда Кери Блейр представляет собой модификацию базовой транспортной среды Стюарта, предназначенную специально для фекальных образцов.
- Глицерофосфат, являющийся метаболитом некоторых энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, и др.), заменен неорганическим фосфатом,
- удален метиленовый синий и рН среды увеличена до 8,4.
- Среда Кери Блейр позволяет сохранять большинство патогенов, включая требовательные микроорганизмы, такие как *Neisseria sp.*, *Haemophilus sp.*, *Streptococcus sp.*
- Данная среда является стандартной для транспортировки анаэробов.



# Транспортная система со средой Эймса

- Транспортная среда Эймса представляет собой очередную модификацию базовой транспортной среды Стюарта, в которой глицерофосфат заменен неорганическим фосфатом, поскольку глицерофосфат является метаболитом некоторых энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.) и может поддерживать рост некоторых грамотрицательных микроорганизмов.
- Метиленовый синий заменен на активированный уголь фармацевтического качества.
- В среду добавлены кальций и магний для поддержания проницаемости бактериальных клеток.
- Эта среда способна более 3 дней поддерживать такие микроорганизмы, как *Neisseria sp.*, *Haemophilus sp.*, *Corynebacteria*, *Streptococci*, *Enterobacteriaceae* и др., однако наилучшие результаты дает культивирование в течение первых 24 часов.

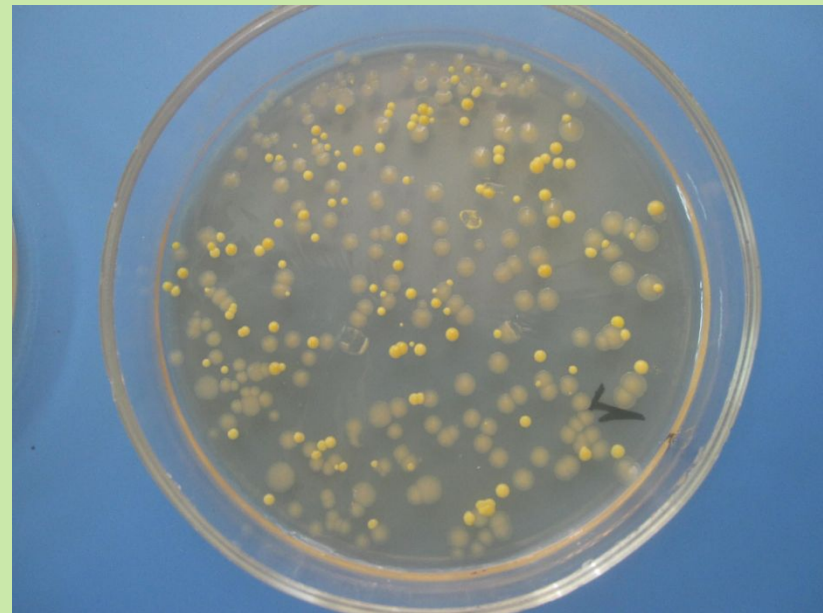


# Универсальные накопительные среды

## Мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ)

- Являются основными средами для посевов микроорганизмов, для проверки чистоты культур перед биохимическим и серотипированием.
- Их используют для культивирования и подсчета неприхотливых микроорганизмов. В полужидком виде среда может быть использована для хранения контрольных (эталонных) микроорганизмов.

Аналог – среда ГРМ (гидролизат рыбной муки)



Состав (г/л):

Пептический перевар животной ткани	5,00
Мясной экстракт	1,50
Дрожжевой экстракт	1,50
Натрия хлорид	5,00
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,4 ± 0,2



# Универсальные накопительные среды

## Среда Хоттингера

- Предназначен для культивирования различных микроорганизмов, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, некоторые виды стрептококков. При необходимости может быть обогащен углеводами, солями.
- Содержит гидролизат Хоттингера, который получают путём ферментативного гидролиза мясного фарша (говяжьего) панкреатином с последующим фильтрованием и добавлением хлороформа в качестве консерванта.



Состав (г/л):

Ферментативный гидролизат животной ткани 5,00

Фосфат калия 10,0

Натрия хлорид 5,00

Агар-агар 15,00

Конечное значение pH (при 25°C)  $7,4 \pm 0,2$

# Универсальные накопительные среды

## Среда Мюллера-Хинтона

- Эту среду используют для культивирования *Neisseria sp.*

и

- для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам.

Состав (г/л):

Мясной настой 300,00

Гидролизат казеина 17,50

Крахмал 1,50

Агар-агар 17,00

Конечное значение pH (при 25°C)  $7,3 \pm 0,2$



# Специальные дифференциально-диагностические среды

Предназначены для выявления биохимических особенностей, характерных для данной таксономической группы

Таблица 4

Дифференцирующие компоненты дифференциально-диагностических сред

Компонент	Определяемый признак
Углеводы: арабиноза, глюкоза, галактоза, ксилоза, лактоза, мальтоза, рафиноза, рамноза, сахароза, фруктоза, целлобиоза	Способность использовать в качестве источника углерода
Спирты: глицерол, адонит, эритрит, маннит, дульцит, сорбит	Способность использовать в качестве источника углерода
Цитраты, малонаты, тартраты	Способность использовать в качестве источника углерода
Аминокислоты: аргинин, глутаминовая кислота, лизин, орнитин	Наличие декарбоксилазы
Фенилаланин	Наличие дезаминазы
Триптофан	Образование индола
Мочевина	Наличие уреазы
Желатин	Наличие протеаз
Желток яичный	Наличие лецитиназы
О-нитрофенол, $\beta$ -Д-Галактопиранозид	Наличие галактозидазы
Соли $Fe^{++}$	Образование $H_2S$

# Специальные дифференциально- диагностические среды

Таблица 5

Свойства кислотно-основных индикаторов (ЧДА)

Индикатор	Интервал pH	Цвет среды
Бромфеноловый синий	3,0–4,6	желтый-синий
Метиловый красный	4,2–6,3	красный-желтый
Бромкрезоловый пурпурный	5,2–6,8	желтая-пурпуровая
Бромтимоловый синий	6,0–7,6	желтая-синяя
Водно-голубой + розоловая кислота	6,2–8,0	синяя-розовая
Нейтральный кислый	6,8–8,0	красная-желтая
Феноловый красный	6,8–8,4	желтая-красная

# Дифференциально-диагностические среды

## Среда МакКонки

- Среда МакКонки в качестве дифференциальных рекомендуют для селективного выделения энтеробактерий и близких к ним грамотрицательных палочек.



Рост на среде МакКонки (M082) колоний *Escherichia coli* (крупные красные), *Salmonella* серовара *Typhi* (бесцветные), *Staphylococcus aureus* (мелкие красные) *Enterococcus faecalis* (точечные)

Лактозоположительные штаммы растут с образованием розовых или красных колоний, которые могут быть окружены зоной преципитации желчных солей.

Красный цвет появляется в результате закисления среды продуктами разложения лактозы (при падении рН ниже 6,8) и адсорбции нейтрального красного.

Штаммы, не ферментирующие лактозу (шигеллы, сальмонеллы), обычно образуют прозрачные бесцветные колонии и не изменяют среду.

### Основные компоненты среды МакКонки:

**Питательная основа:** Пептический перевар животной ткани, Протеозопептон, Гидролизат казеина, Панкреатический перевар желатина, Лактоза

**Дифференцирующий фактор** Соли желчных кислот (1,5г/л), Натрия хлорид (5г/л)

**Индикатор** Кристаллический фиолетовый, Нейтральный красный

# Дифференциально-диагностические среды

## Среда Эндо

- Эту среду рекомендуют для выделения и дифференциации грамотрицательных микроорганизмов кишечной группы.
- Эта среда разработана Endo как культуральная среда для дифференциации микроорганизмов, ферментирующих и неферментирующих лактозу. Она используется для микробиологического исследования воды, стоков, молочных и других пищевых продуктов.
- Сульфит натрия и основной фуксин обладают подавляющим эффектом на грамположительные микроорганизмы. Лактоза разлагается микроорганизмами до альдегида и кислоты. Альдегид в свою очередь освобождает фуксин из фуксин-сульфитного комплекса, усиливая красное окрашивание колоний. У кишечных палочек эта реакция очень выражена и сопровождается кристаллизацией фуксина, что проявляется зеленоватым металлическим блеском (фуксиновый глянец) колоний.



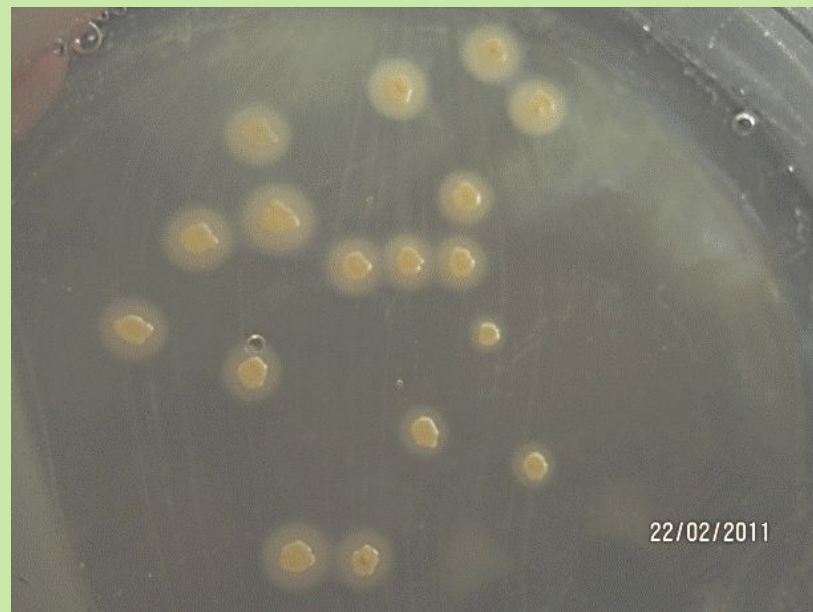
Состав (г/л):  
Пептический перевар животной ткани 10,00

Лактоза	10,00
Калия гидрофосфат	3,50
Натрия сульфит	2,50
Фуксин основной	0,50
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,5 ± 0,2

# Дифференциально-диагностические среды

## Желточно-солевой агар

- Эту среду используют в качестве селективной для выделения клинически значимых культур стафилококков.
- Среда содержат протеозопептон и мясной экстракт, что делает ее очень питательной ввиду содержания необходимых ростовых факторов. Вместе с тем рост бактерий, кроме стафилококков, подавляется высокой концентрацией (7,5%) хлорида натрия.
- Маннит является ферментируемым и дифференцирующим субстратом, а также источником углерода.
- Добавление (до 5% об/об) эмульсии яичного желтка дает возможность определить липазную активность микроорганизмов. Эмульсия в солевой среде становится прозрачной, поэтому при наличии липазной активности вокруг колоний формируется желтая непрозрачная зона.



Состав (г/л):

Протеозопептон	10,00
Мясной экстракт	1,00
Натрия хлорид	75,00
D-Маннит	10,00
Феноловый красный	0,025
Агар-агар	15,00
Конечное значение рН (при 25°С) 7,4 ± 0,2	

# Дифференциально-диагностические среды

## Вильсона-Блера или Висмут-сульфитный агар

- Селективная среда для выделения сальмонелл.
- Пептический перевар животной ткани и мясной экстракт служат источником азотистых питательных веществ, углерода, серы, витаминов группы В и микроэлементов, необходимых для роста указанных бактерий.
- Бриллиантовый зеленый подавляет рост всех грамположительных бактерий. Глюкоза является ферментируемым углеводом. Сульфат железа позволяет выявить продукцию сероводорода.
- Висмут является тяжелым металлом, который подавляет рост большинства грамотрицательных кишечных бактерий, кроме сальмонелл.
- Сальмонеллы восстанавливают сульфат железа в присутствии глюкозы и сульфита висмута до сульфида железа, который окрашивает их колонии в черный цвет.



Состав (г/л):

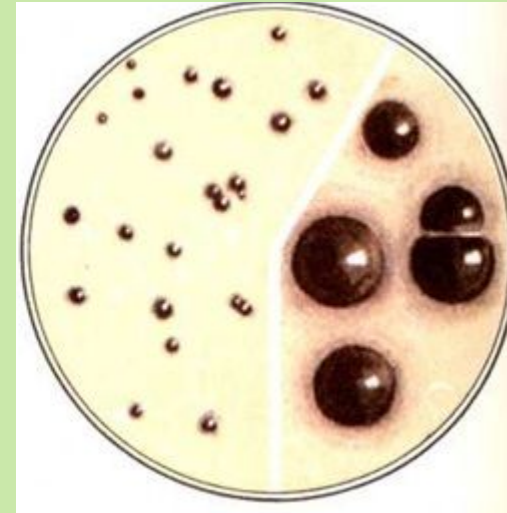
Пептический перевар животной ткани	10,00
Мясной экстракт	5,00
Глюкоза	5,00
Натрия гидрофосфат	4,00
Железа сульфат	0,30
Висмута сульфит, индикатор	8,00
Бриллиантовый зеленый	0,025
Агар-агар	20,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,7 ± 0,2



# Специальные селективные среды

## Среда Леффлера

- Эту среду с добавлением лошадиной сыворотки используют для культивирования *Corynebacterium diphtheriae* из клинического материала и пересевов чистых культур этих микроорганизмов.
- Высокая концентрация сыворотки помогает определить протеолитическую активность микроорганизмов, а также пигментообразование. Пептон и мясной экстракт обеспечивают микроорганизмы важнейшими питательными веществами. Глюкоза является ферментируемым субстратом и источником энергии.



Состав (г/л):

Пептон специальный 2,50

Мясной экстракт 2,50

Натрия хлорид 1,25

Глюкоза 2,50

Конечное значение pH (при 25°C) 7,3 ±

Перед разливом по чашкам добавить  
750 мл стерильной лошадиной  
сыворотки

# Специальные селективные среды Кампилобакагар

- Селективная среда для кампилобактерий которая состояла из основы кровяного агара с бараньей кровью или лошадиной кровью и антибиотиками .
- Антимикробные компоненты, существенно подавляют рост нормальной микрофлоры, способствуя росту и выделению из испражнений *Campylobacter fetus ssp. jejuni*.
- Присутствие амфотерицина В в добавке существенно или полностью подавляет рост грибов, введенный позже цефалотин усиливает подавление нормальной кишечной микрофлоры .
- Колонии *Campylobacter fetus ssp. jejuni* имеют слизистый характер, плоские серые с неправильными очертаниями или приподнятые, округлые, без гемолиза.
- Некоторые штаммы могут образовывать желто-коричневые или розоватые колонии.
- На влажной поверхности среды может наблюдаться слияние роста или роение.



Основа состав (г/л):

Протеозопептон	15,00
Печеночный перевар	2,50
Дрожжевой экстракт	5,00
Натрия хлорид	5,00
Агар-агар	12,00

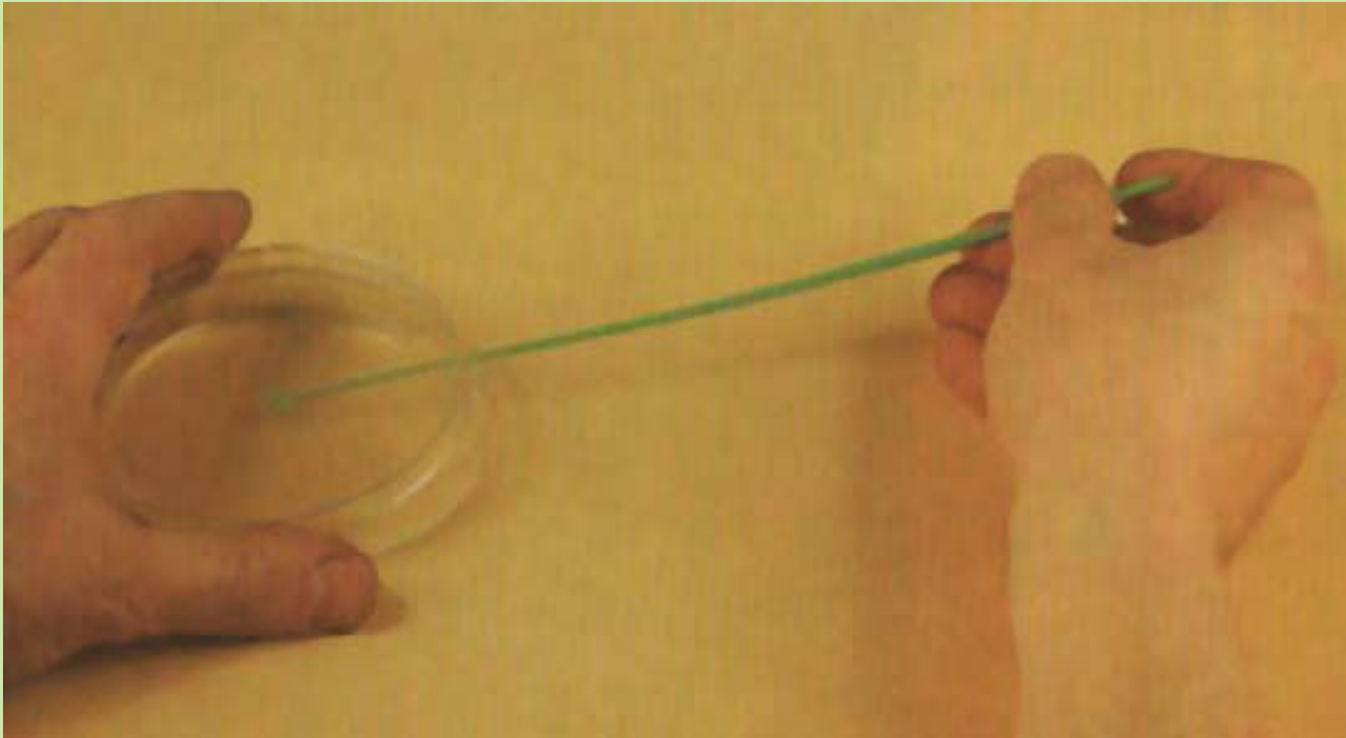
Селективная добавка :

Полимиксин В	1250 МЕ
Ванкомицин	5,0 мг
Триметоприм	2,5 мг
Амфотерицин В	1,0 мг
Цефалотин	7,5 мг

Конечное значение pH (при 25°C) 7,4 ± 0,2

Перед розливом среды в нее добавляют: стерильную лизированную кровь лошади (до 5-7% об/об) или стерильную дефибринированную баранью кровь (до 10%) и селективную добавку для кампилобактеров

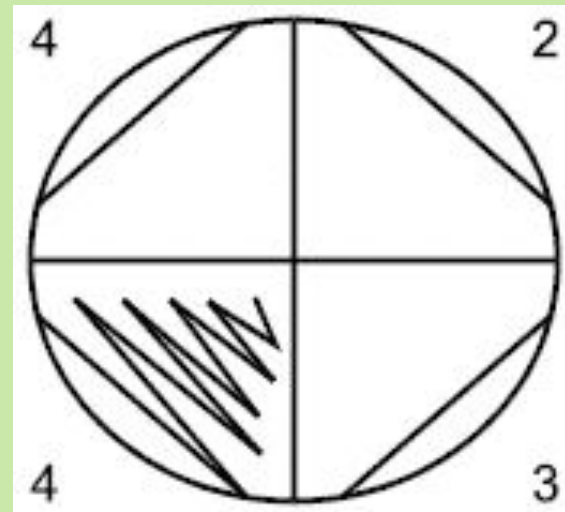
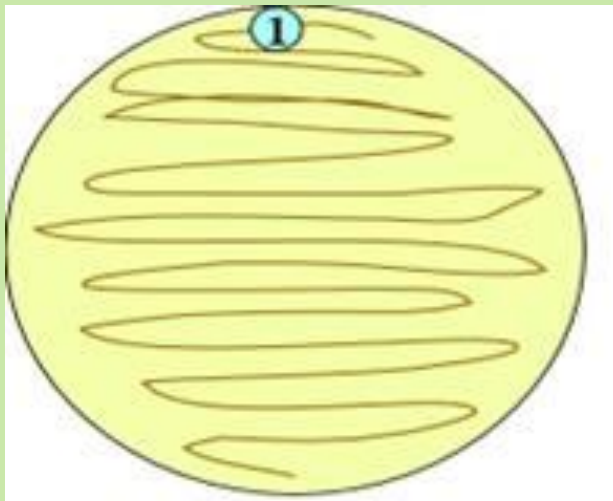
# Техника посева на питательные среды



# Методы выделения чистой культуры

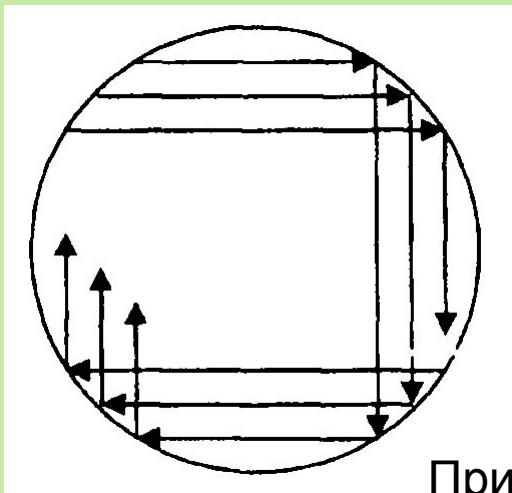
- **Чистой культурой** называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий - обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике инфекционных болезней, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и, в целом, при любой работе с микроорганизмами.
- Исследуемый материал (гной, мокрота, фекалии, кровь и другой материал от больных; вода, почва, воздух, пищевые продукты, трупы животных и человека, переносчики) обычно содержит ассоциации микробов.
- Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, то есть производится его идентификация.

# Посев однократным истощающим штрихом

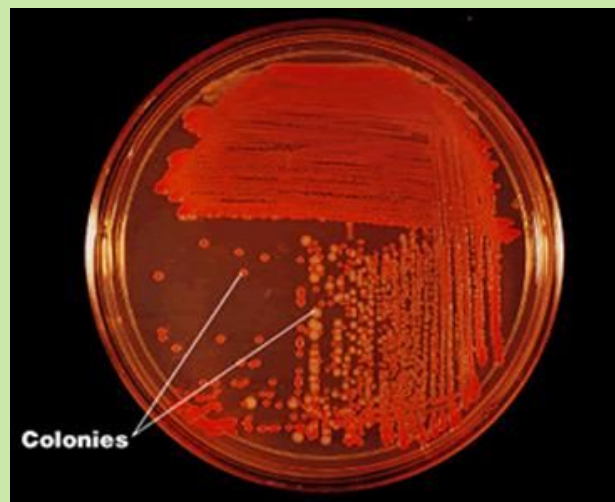
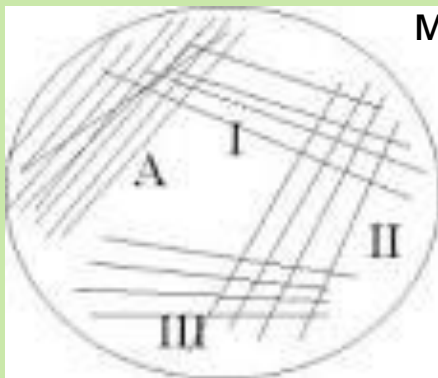


Посев по  
секторам

# Посев истощающим штрихом секторами



Применяют для определения микробного числа мочи

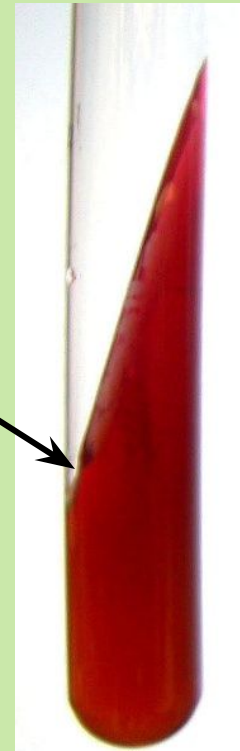


# Учет результатов посева мочи секторным методом

A	I	II	III	К-во в 1 мл
1-6	-	-	-	<1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
не сосч.	20-30	-	-	500000
-"-	40-60	-	-	1 млн.
-"-	100-150	10-20	-	5 млн.
-"-	не сосч.	30-40	-	10 млн.
-"-	-"-	60-80	ед.кол.	100 млн.

# Посев на скошенный агар, метод Шукевича

- Посев на скошенный агар применяют для накопления и хранения чистой культуры бактерий
- Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара . Подвижные микроорганизмы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару , неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересевая верхние края культуры можно получить чистую культуру.



Место посева культуры по Шукевичу



Посев однократным штрихом



# Посев уколом



Рис. 56. Посев уколом.

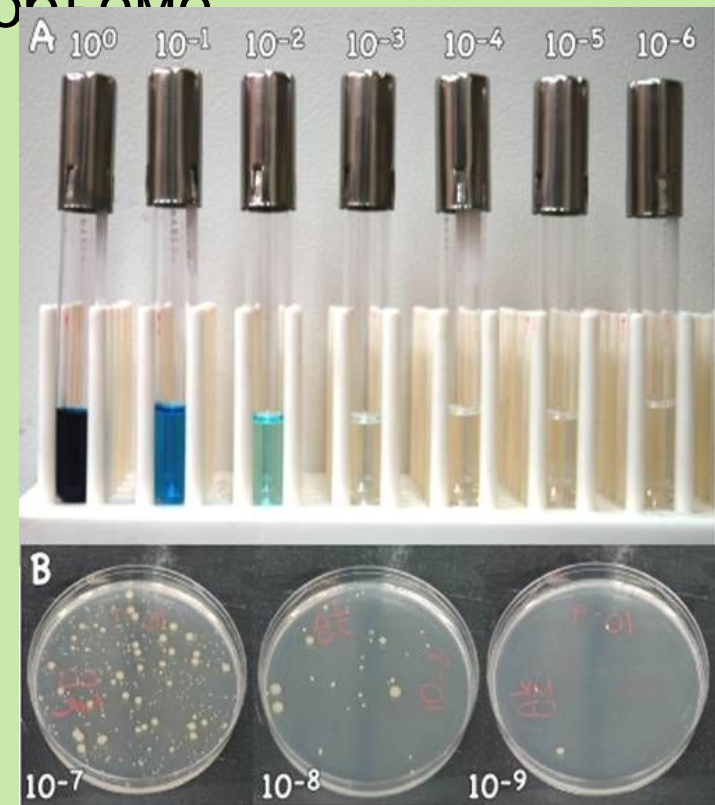
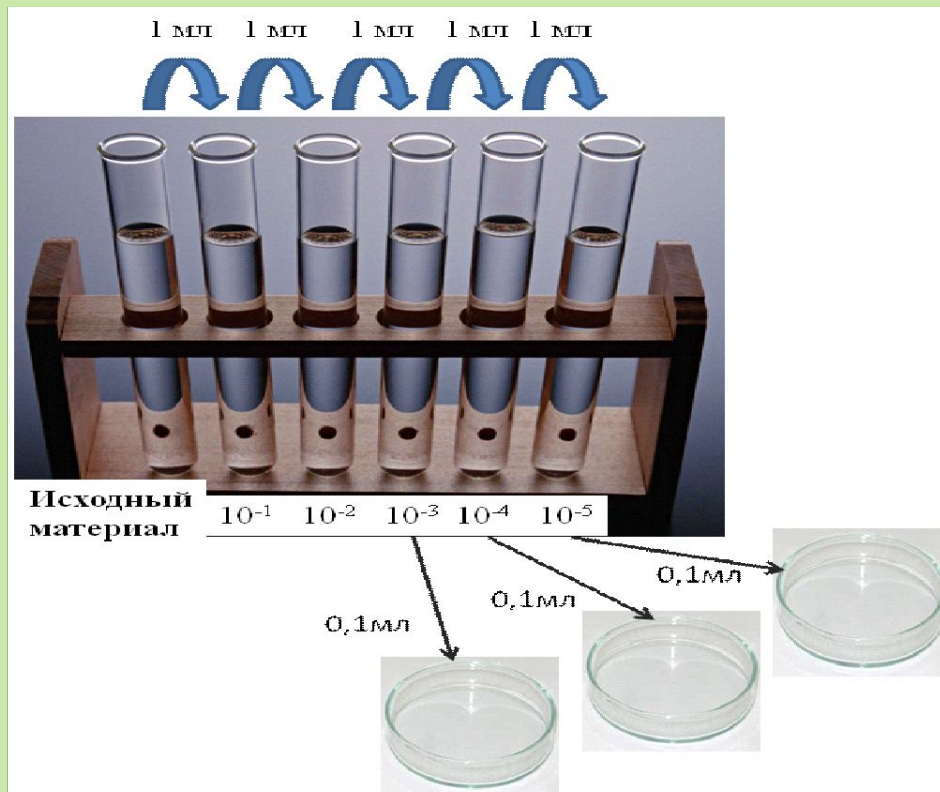
# Метод Дригальского

0,1мл материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1-7 сут выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

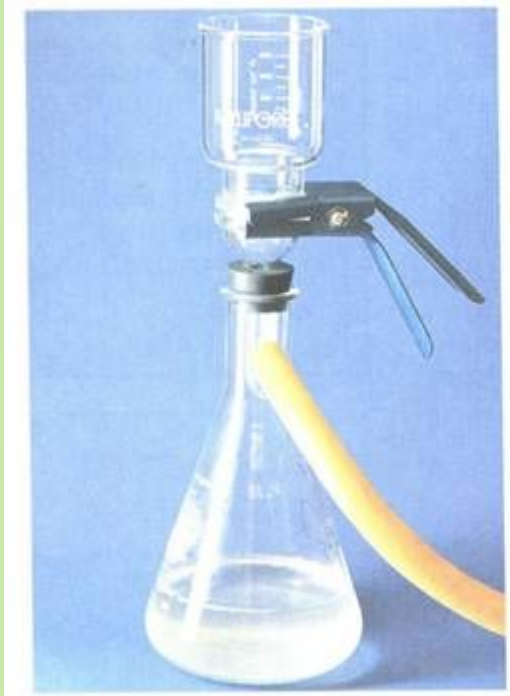


# Метод Коха (метод серийных разведений)

- последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации одной клетки в объеме



# Метод мембранных фильтров



**Спасибо за  
внимание!**