Содержание:

Введение

Типы питательных сред

Жидкие питательные среды

Твердые питательные среды

Заключение

Список литературы

## Введение

Под питательными средами подразумевают различного рода субстраты, приготовляемые для изучения жизнедеятельности микроорганизмов при определенных условиях, изменяемых по воле экспериментатора. Микрохимические анализы и опыты искусственной культуры выяснили потребность бактерий в питательных веществах. Согласно этим указаниям и составляются питательные среды. Существенным условием при этом является определенное содержание ***воды****.* Сухие органические вещества не заселяются микробами; соление консервирует мясо, отнимая у него известное количество воды. Первенствующее значение для жизнедеятельности микроорганизмов имеет затем ***реакция*** питательной среды; для большинства бактерий она должна быть ***нейтральной*** или ***слабощелочной***, рост холерного вибриона прекращается уже при слабокислой реакции. Вас. erythosporus и micrococcus aquatilis размножаются даже в дистиллированной, 2 раза перегнанной воде, удовлетворяясь, очевидно, тем ничтожным количеством органических веществ, какое содержится и в чистой перегнанной воде, или, быть может, питаясь за счет азота и углерода атмосферного воздуха. Некоторые микроорганизмы заимствуют нужный им для питания азот из аммиачных или азотнокислых соединений, другие безусловно требуют наличности в питательной среде белковых веществ.

Большинство болезнетворных микроорганизмов хорошо растут в бульоне, мясопептонной желатине и на агаре; другие, наоборот, нуждаются в питательной среде (кровяной сыворотке, агаре, смазанном кровью, и т.п.), по составу своему приближающейся к составу тканей и соков животного организма.

Некоторые строго паразитные бактерии совершенно не выращиваются на мертвом субстрате, размножаясь лишь в организме живого существа и даже иногда определенного животного. До сих пор не удается культивировать на какой-либо искусственной питательной среде лепрозную палочку, некоторые слюнные бактерии, спирохету возвратной горячки и др.

## Типы питательных сред

Питательные среды бывают ***жидкие*** и ***твердые****.* Главное преимущество ***жидких*** сред заключается в возможно равномерном распределении в них зародышей; этим дается возможность всегда работать с точно отмеренным количеством бактерий, что особенно важно при опытах с впрыскиванием последних животным для изучения силы болезнетворного действия микрофитов. Разводка микроорганизма в жидкой среде, введенная в полое предметное стекло, дает нам возможность изучить непосредственно под микроскопом рост и деление клеток, образование микрофитом различных сочетаний, появление в нем спор и их прорастание. Бульонные культуры патогенных бактерий, освобожденные соответственной фильтрацией от живых зародышей, представляют чистые растворы продуктов вещественного обмена микроорганизмов, различного рода бактерийные яды (токсины), знакомство с которыми имеет первенствующее значение для уразумения сущности заразных болезней. Разводки в молоке, пептонной воде и др. дают нам ценные указания для биологической характеристики многих микроорганизмов, для отличия их друг от друга. Жидкими средами можно пользоваться, однако, лишь тогда, когда в распоряжении имеется уже чистая разводка того или другого микроорганизма; ***разъединение*** же зародышей, вылавливание одного из них из той смеси различнейших видов бактерий, которая встречается в окружающей нас природе, возможно лишь при помощи плотного субстрата, консистенция которого препятствует смешиванию между собой различных микроорганизмов, растущих здесь совершенно особняком и на надлежащем друг от друга расстоянии. Неожиданно быстрое развитие, достигнутое бактериологией в последние 10 - 15 лет, главным образом обязано введению Р. Кохом в бактериологическую технику твердых прозрачных субстратов. Питательные среды до посева исследуемого микроорганизма должны быть тщательно обеспложены, с целью устранения случайно поселившихся в них посторонних бактерий.

## Жидкие питательные среды

***Мясопептон-бульон****. 5*00 г мяса, освобожденного от жира, костей, сухожилий и апоневрозов и пропущенного через мясорубку, обливают литром дистиллированной воды, после чего смесь оставляется для полного выщелачивания в прохладном месте. Через сутки получившийся настой пропускают через несколько слоев марли, сильно выжимая при этом задерживаемое марлей мясо, до получения 1 литра мясной воды; к последней прибавляют 10 г пептона и 5 г поваренной соли и затем жидкость кипятят с 3/4 часа на голом огне до полного свертывания всех нерастворимых белков, после чего она охлаждается и фильтруется. Полученный кислый бульон (свежее мясо обладает кислой реакцией) нейтрализуется едким натром до слабощелочной реакции, кипятится затем ровно 5 минут и в горячем виде отфильтровывается. Разливают готовый бульон в колбочки, пастеровские ballons-pipettes или в пробирки и стерилизуют нагреванием в коховском текучепаровом аппарате в течение 2 часов или в папиновом котле (при 115°) в течение 15 минут. Вместо мяса для приготовления мясопептон-бульона пользуются также готовым мясным экстрактом Либиха, что значительно упрощает дело. На 1 литр воды берут 30 г пептона, 5 г виноградного или тростникового сахара и столько же экстракта. Жидкость подвергается продолжительному кипячению и после полного охлаждения пропускается через толстый слой животного угля, насыпанного в обыкновенный фильтр из шведской бумаги. Этим путем удается получить прозрачный и неокрашенный субстрат. - Мясопептон-бульон употребляется или сам по себе, как прекрасная среда для питания и размножения многих сапрофитов и болезнетворных микроорганизмов, или как исходный материал для приготовления твердых субстратов. В бульонных разводках обращают внимание, остается ли жидкость в главной своей массе чистой, или она помутнела. Неподвижные бактерии, размножаясь в бульоне, опускаются на дно пробирки в виде облачка, хлопьев или порошковидного осадка; обладающие же самостоятельным движением вызывают равномерное помутнение жидкости, осаждаясь лишь впоследствии. Образование пленки на поверхности бульона позволяет в грубых чертах судить о степени потребности засеянного микроорганизма в кислороде. Прибавлением к бульону 6-8% глицерина получается среда, весьма благоприятная для бугорчатых палочек, разрастающихся здесь на поверхности в виде толстых, складчатых пленок; особенно пригоден для этой цели бульон (с глицерином), приготовленный из телячьих легких.

***Пептонная вода.*** Многие микроорганизмы вырабатывают из белковых веществ ароматические основания - главным образом индол, отчасти также фенол, скатол и тирозин; другие (холерный вибрион) одновременно с индолом вырабатывают также и азотистые продукты. Индоловая реакция служит для отличия друг от друга некоторых бактерий. Она получается лишь при наличности в питательной среде пептонов; присутствие сахара вредит реакции, а потому для получения последней пользуются чистым раствором панкреатического пептона или, что проще, нейтрализованным раствором пептона (1%) и поваренной соли (0,5%) в воде.

***Молоко*** весьма часто употребляется для испытания способности микроорганизма разлагать молочный сахар с выделением кислот (молочной, уксусной и др.), свертывающих молоко; одни микроорганизмы свертывают молоко, другие этой способностью не обладают. Молоко, даже только что выдоенное, весьма нередко содержит споры, упорно противостоящие высокой температуре, а потому обеспложивание его требует особенной тщательности. Нагревают его 1/4 часа в автоклаве при 120°; но так как вследствие карамелизации сахара при такой высокой температуре оно нередко буреет и вообще несколько изменяется в своих свойствах, то рациональнее стерилизовать молоко четыре дня подряд, по 1/2 часа, в коховском текучепаровом аппарате.

***Молочную сыворотку*** предложил Petruschky для определения количества вырабатываемых бактериями свободных щелочей и кислот. Совершенно свежее молоко, разбавленное равным объемом воды, слегка нагревается, после чего к нему прибавляют разведенной соляной кислоты в количестве, достаточном для выпадения казеина, который затем отфильтровывается. Жидкость нейтрализуется содой, нагревается часа 2 в аппарате Коха и снова фильтруется от выпадающего при нагревании последнего остатка казеина. Получающаяся сыворотка должна быть строго нейтральной реакции и прозрачна как вода, лишь с легким желтовато-зеленым оттенком. По прибавлении к жидкости чувствительной лакмусовой настойки ее разливают в пробирки совершенно одинакового размера и стерилизуют 3 дня подряд при 100°.

***Безбелковые* *питательные растворы.*** Пастер еще в 1858 г. показал, что дрожжевые грибки для своего роста не нуждаются в белковых веществах, заимствуя, подобно зеленым растениям, нужный им азот из аммиака. Предложенная Пастером безбелковая жидкость изменена была Мейером, Коном, Ушинским и К. Френкелем. Раствор последнего (0,5% поваренной соли, 0,2% двуфосфорнокислого калия, 0,6% молочнокислого аммония, 0,1% аспарагина) дает весьма благоприятные условия для роста многих гнилостных и патогенных бактерий. Особенное место между безбелковыми питательными средами занимает жидкость Капальди и Проскауера, представляющая одно из драгоценнейших средств для отличия друг от друга брюшнотифозной палочки и bac. coli communis, как известно, сходных между собою по морфологическому характеру, неспособностью окрашиваться по Грамму и одинаковому росту на желатине и агаре. Жидкость эта готовится растворением в 100 куб. см воды 0,2 аспарагина, 0,2 маннита, 0,02 хлористого кальция и 0,02 двукислого фосфорнокислого натрия. Она нейтрализуется щелочью и после прибавления к ней лакмуса стерилизуется. Тифозная палочка для удовлетворения потребности в азоте безусловно нуждается в белковых веществах, а потому и не растет в этой жидкости и не изменяет ее реакции; кишечная же палочка менее требовательна к питательным средам, нужный ей для питания азот она берет из амидных соединений (аспарагина, креатина, сукцинамида и др.) и даже из аммиачных солей некоторых органических и минеральных кислот, а потому, в противоположность тифозной палочке, хорошо размножается в питательных средах Капальди и Проскауера и благодаря разложению маннита сообщает ей через 20 часов резко кислую реакцию.

***Куриные яйца*** в сыром виде представляют питательную среду, состоящую из ***живого белка****.* Свежие яйца тщательно очищаются снаружи мылом, обмываются обеспложенной водой и обтираются обеспложенной ватой. В одном из полюсов яйца прокаленной иглой делается точечное отверстие, через которое глубоко вводится на платиновой проволоке заразный материал. Отверстие закрывается каплей растопленного сургуча.

***Водянистая влага глаза*** имеет важное значение для изучения под микроскопом хода развития микроорганизмов. Для получения ее вынимают глаз только что убитого животного, прижигают роговицу раскаленной стеклянной палочкой, прокаливают прижженное место острием стерилизованной пастеровской пипетки, в которую при легком давлении на глазное яблоко и поступает humor aqueus. Вынимают пипетку и запаивают кончик ее на пламени. Жидкость сохраняется до востребования.

## Твердые питательные среды

Твердые питательные среды распадаются на ***прозрачные*** (мясопептон-желатина, мясопептон-агар, кровяная сыворотка и др.) и ***непрозрачные* (**картофель, рис, хлебная мезга и пр.).

***Прозрачные питательные среды:***

***Мясопептонная желатина.*** К бульону, приготовленному вышеописанным способом, прибавляют листовой, лучшего качества желатины в количестве 5% зимой и 10-12% в теплое время года. При постоянном помешивании жидкость нагревается до полного растворения желатины, после чего прибавлением щелочи придают ей нейтральную или слабощелочную реакцию (продажная желатина обладает кислой реакцией). Жидкость кипятится 1/4 часа, вновь становясь нередко слабокисловатой, почему новым добавлением щелочи восстановляют ее прежнюю реакцию. Для лучшего просветления жидкости ее предварительно охлаждают до 40-50° С, прибавляют тщательно взбитый с водой яичный белок и снова подвергают ее сильному кипячению в течение 20 минут; при этом белок, свертываясь в виде плотных комков, захватывает мельчайшие частицы, вызывающие мутноватость желатины. Остается профильтровать желатину. Для отделения плотных комков яичного белка ее пропускают предварительно через несколько слоев марли, после чего она подвергается фильтрации через смоченный кипятком складчатый фильтр из шведской бумаги. Стеклянная воронка с фильтром помещается в другую плантамуровскую воронку, в которой между двойными станками находятся горячая вода, благодаря чему фильтрование, совершающееся при высокой температуре, происходит довольно быстро и желатина не застывает на фильтре. Процеженная желатина должна быть совершенно прозрачна, слегка лишь окрашена и нейтральной или слабощелочной реакции; она разливается в пробирки и обеспложивается три дня подряд по 20 мин. в коховском аппарате. Продолжительное, в течение нескольких часов, кипячение желатины с целью ее стерилизации не допускается, так как она теряет при этом способность застывать.

***Мясопептон-агар.*** Агар представляет собой растительный студень, добываемый из растущих в Ост-Индии и Японии различного рода водорослей; он распускается лишь при температуре, близкой к точке кипения воды, и снова застывает уже при 40° С; благодаря своей тягучести он даже в 40° С растворе фильтруется с большим трудом, почему при приготовлении из агара питательной среды его размягчают в автоклаве при 120° или подвергают его кипячению в течение нескольких часов. К***слабощелочному*** мясопептон-бульону прибавляют 1,5-2% ***агара***, колбу с жидкостью ставят на час в автоклав при 120°, после чего при пользовании плантамуровской воронкой агар довольно легко проходит через фильтр. Предварительная перед фильтрацией нейтрализация жидкости не нужна, так как агар сам по себе имеет нейтральную реакцию. Профильтрованный мясопептон-агар, разлитый в пробирки, обеспложивается в один сеанс нагреванием в автоклаве при 120° в течение 1/2 часа. Если в распоряжении не имеется автоклава, то поступают следующим образом: кипятят в чугунном эмалированном котелке 20,0 агара с 3-4 литрами воды в течение 2-3 часов; к остающейся жидкости прибавляют литр бульона и снова кипятят до получения одного литра; этим путем точно так же получается хорошо фильтрующийся агар (Н. Шульц). К агару, а равно и к желатине, для той или другой специальной цели прибавляют часто различные другие вещества. Так, прибавление виноградного сахара (1-2%), индиготина (0,5-1%), муравьинокислого натра (0,25-0,5%) необходимо для питания и размножения анаэробных бактерий, нуждающихся, как известно, в восстановляющих, легко отдающих свой кислород веществах. Прибавлением к агару глицерина (6-8%) получается плотная питательная среда, весьма пригодная для роста бугорчатой палочки. Агар с 1-2% виноградного сахара представляет лучший субстрат для испытания ферментативной способности бактерий: будучи засеян вызывающим брожение микроорганизмом, сахарный агар (при 37°) уже через 1-2 часа обнаруживает несколько пузырей газа, количество которых через сутки увеличивается настолько, что агар расщепляется на несколько отстоящих друг от друга на 1-3 см участков. Прекрасную питательную среду для роста многих патогенных бактерий, особенно различного рода вибрионов, представляет мясопептонный агар или желатина с прибавлением к ним ***алкалиальбумината***, приготовляемого по способу Дейке: 3000,0 телятины дигерируются в течение суток с 1200 куб. см 3% раствора KHO; жидкость фильтруется и к прозрачному, окрашенному в темно-бурый цвет, фильтрату прибавляется соляная кислота до выпадения альбуминатов; последние отфильтровываются, размешиваются в небольшом количестве воды и подщелачиваются. Жидкость выпаривается, высушивается в порошок, который в количестве 2,5% прибавляется к мясопептонной желатине или агару. Алкалиальбуминат Дейке продается и в готовом виде. Из всех примесей к агару наибольшее значение имеет примесь крови; на такой среде Пфейферу удалось вырастить палочку инфлюэнцы. Берут из мякоти пальца, при обычных антисептических предосторожностях, несколько капель крови и размазывают их платиновой проволокой по поверхности косо застуженного агара; до употребления в дело пробирки ставятся на сутки в термостат (при 37°); пользуются лишь теми пробирками, которые после этой пробы не обнаружили никакого загрязнения. Как желатина, так и агар имеют свои достоинства и недостатки, и одна из этих сред не всегда может заменить другую. Агар употребляется главным образом для культивирования патогенных бактерий и вообще микроорганизмов, живущих при температуре тела (37°); желатиной, распускающейся уже при 25°, можно пользоваться, наоборот, лишь при комнатной температуре. На косо застывшем агаре в пробирках микроорганизмы сравнительно дольше сохраняют свою жизнеспособность, чем в желатине, так как вследствие выделения конденсационной воды собирающейся в нижней части пробирки агар в течение долгого времени предохранен от высыхания. Главный недостаток агара заключается в том, что, представляя собой тело, близко стоящее к углеводам, он не проявляет свойственной многим бактериям способности вырабатывать протеолитические, растворяющие белки ферменты; наоборот, желатина, как тело белковинное, пептонизируется и разжижается подобными бактериями, что имеет немаловажное значение для биологической их характеристики. Разжижение желатины некоторыми бактериями имеет и свои невыгодные стороны, препятствуя более или менее продолжительному наблюдению не разжижающих желатину бактерий, находящихся в исследуемом материале (воде, почве и т.п.) вместе с разжижающими микроорганизмами: последние заглушают собой рост первых. Вообще, при бактериологических исследованиях необходимо одновременно пользоваться обоими субстратами.

Весьма важную питательную среду для бактерий представляет ***кровяная сыворотка****.* Представляя собой прозрачный, плотный субстрат, приготовляемый из крови, она по составу своему лучше других сред удовлетворяет разнообразным требованиям, предъявляемым многими живущими в человеческом и животном организме болезнетворными микроорганизмами (палочкой дифтерита, туберкулеза и др.). Добывание крови для приготовления сыворотки и стерилизация последней связаны с немалыми затруднениями. Рациональнее всего пользоваться способом Ру и Нокорда, при котором в момент взятия крови исключается попадание зародышей из воздуха, чем устраняется необходимость стерилизации субстрата. В яремную вену животного вкалывается при соблюдении антисептических предосторожностей троакар; вынув из него иглу, вставляют стеклянную трубку, нижним своим концом переходящую через ватную пробку в узкий, высокий, тщательно обеспложенный цилиндр, собирающий кровь. Последняя оставляется в прохладном месте на 48 часов; отстоявшаяся за это время совершенно прозрачная, янтарно-желтого цвета сыворотка снимается обеспложенными пипетками в обеспложенные пробирки; последние кладут затем в особый термостат, дно которого слегка наклонено, и сыворотка без предварительной стерилизации подвергается здесь в косом положении свертыванию в течение 30-60 минут при 68°. Свертывание производится при косом положении пробирки с целью образования сывороткой по ее оплотнении широкой поверхности. Этот точный способ доступен лишь в лабораториях, имеющих в своем распоряжении какое-либо крупное животное (лучше всего лошадь), могущее дать время от времени большое количество крови (из 1-1,5 литров получается не больше 100-200 куб. см сыворотки). Обыкновенно приходится брать кровь на бойне и полученную через 2 дня сыворотку подвергать предварительно обеспложиванию по Тиндалю, нагреванием 8 дней подряд по 1 часу при 58°. Быстрое однократное обеспложивание сыворотки при высокой температуре невозможно: уже при темп., не превышающей 70°, она становится негодной, превращаясь в грязно-серую, мутную, непрозрачную массу. Если кровяная сыворотка не предназначена для немедленного употребления, то, по Кох-Кирхнеру, для ее стерилизации пользуются хлороформом, который, будучи прибавлен в количестве 1 куб. см на 100 куб. см сыворотки, в течение 2 месяцев вполне ее обеспложивает. Колбочки с содержимым во избежание испарения хлороформа тщательно закупориваются резиновыми пробками, которые заливаются парафином. В этом виде сыворотка сохраняется неограниченно долгое время. При необходимости пользования ею резиновые пробки заменяются обеспложенными ватными пробками, и колбочки ставятся на несколько дней в термостат для испарения хлороформа; сыворотка, разлитая затем в обеспложенные пробирки, подвергается обычным путем свертыванию. Баранья или телячья кровяная сыворотка, смешанная, по Лёффлеру, в отношении 3: 1 с телячьим бульоном, содержащим 1% пептона, 1% виноградного сахара и 0,5% поваренной соли, представляет лучшую питательную среду для дифтерийной палочки; размазав на поверхности этого субстрата подозрительную пленку, снятую с зева, можно в случае дифтерита уже нередко через 6 часов поставить диагностику, а следовательно, своевременно приступить к лечению противодифтерийной сывороткой. В некоторых специальных случаях, особенно для открытия гонококков, пользуются ***человеческой*** сывороткой, добывая кровь во время родов из последа. После перевязки и перерезки пуповины плацентарный ее конец, предварительно обмытый сулемой и стерилизованной водой, опускают в обезвоженную колбу, куда благодаря продолжающимся сокращениям матки выгоняется из пуповины небольшое количество крови. С целью воспользоваться кровяной сывороткой (которая, будучи раз свернута, более уже не разжижается) и для пластинчатых разводок, т.е. для изоляции бактерий, заражают жидкую обеспложенную, но несвернутую сыворотку прививным материалом и тщательно смешивают ее с 2% растопленным и остуженным до 42° С агаром; смесь разливается затем в чашки Петри, где она и застывает.

## Непрозрачные питательные среды

Из ***непрозрачных*** питательных сред первое место занимает ***картофель.*** Он служит прекрасным субстратом для многих сапрофитов и патогенных бактерий, обнаруживающих на нем характерный типический рост; им пользуются также для сохранения разводок на продолжительный срок и для обнаружения микроорганизмом спорообразования. Крупные, так называемые салатные картофелины очищаются под струей воды от грязи, после чего кончиком картофельного ножа вырезают все подозрительные места (глазки), разрезают картофель на круглые пластинки, кладут их в маленькие двойные чашки и обеспложивают в коховском аппарате. Рациональнее еще пользоваться для разводок на картофеле широкими, в 2,5 см в диаметре, пробирками. Пробочным сверлом вырезают из крупного картофеля цилиндр, разрезают его по диагонали на два клина и вкладывают каждый из них в пробирку широким концом вниз. Для предохранения разводки от загрязнения конденсационной водой, выделяющейся из картофеля, практично пользоваться пробирками, имеющими недалеко от дна кольцеобразное сужение, на котором и покоится картофельный клин, вода же собирается на дно пробирки, ниже сужения. Перед опусканием картофеля в пробирку наливают в последнюю несколько капель воды для предохранения субстрата от высыхания.

Для пигментных бактерий пользуются, по Сойка и Кралю, питательной средой, приготовленной из ***разваренного в молоке риса*:** 100 г рисовой муки, тщательно растертой в ступке с 250 куб. см снятого молока, разваривают при постоянном помешивании в густую кашу и туго набивают последней цилиндрическую трубку. По охлаждении выдавливают рисовый цилиндр из трубки, разрезают его на несколько параллельных дисков, укладывают каждый из них в отдельную чашку, куда наливают еще несколько капель молока, и обеспложивают в течение 1/2 часа в коховском аппарате. На ярком фоне этой среды разноцветные пигментные бактерии выступают очень резко.

***Хлебная мезга***, обладая кислой реакцией, служит хорошей средой для плесневых грибов. Насыпают в эрленмейеровские колбы обыкновенный черный хлеб, высушенный и растертый в мелкий порошок, прибавляют воды до получения однообразной влажной каши и обезвоживают в паровом котле.

## Заключение

Дальнейшие успехи бактериологии и микробиологии зависят главным образом от усовершенствования питательных сред в смысле приближения их к условиям естественного питания микроорганизмов.

## Список литературы

1. К. Френкель, "Основы учения о бактериях"
2. Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней. / Н.А. Семина. - М.: Медицина, 1999
3. Медицинская микробиология / Под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.
4. Санитарная микробиология и вирусология. / З.Н. Качемасова, С.А. Ефремова, А.М. Рыбакова - М.: Медицина, 1987.
5. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М 1976