

М.С.Поляк, В.И.Сухаревич, М.Э.Сухаревич

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Санкт-Петербург, 2002 г.

Авторы: М.С.Поляк, доктор мед.наук, профессор,  
научный директор НИЦФ, зав.лабораторией химиотерапии  
и экспериментальной микробиологии НИТИАФ

В.И.Сухаревич, доктор биол.наук, профессор,  
вед.научный сотрудник НИЦФ

М.Э.Сухаревич, кандидат биол.наук,  
руков.участка ГПС НИЦФ

Книга издана при содействии Научно-исследовательского центра фармакотерапии (НИЦФ)

Научные редакторы: докт.биол.наук Н.Г.Медведева  
канд.мед.наук Г.Е.Гефен

© М.С.Поляк, В.И.Сухаревич, М.Э.Сухаревич

## Предисловие

Это небольшое издание адресовано микробиологам медицинских учреждений, чья профессиональная деятельность ежедневно связана с применением разнообразных питательных сред. От качества, от правильного выбора питательных сред, от таких, казалось бы, «частных» моментов, как хранение, стерилизация, лабораторное приготовление и проверка питательных сред зависит эффективность и информативность важнейшего для клиники аналитического исследования.

Вместе с тем, не будет большим преувеличением сказать, что в последние годы в отечественной микробиологической литературе питательным средам не уделялось того внимания, которого они заслуживают. Это касается не только технологии средоварения, она представляет собой большую и самостоятельную тему, но и практики утилизации питательных сред, той информированности медицинских микробиологов о питательных средах, которая необходима для грамотного их использования. В этой ограниченной по формату книге сделана попытка дать ответ на ряд вопросов: что такое микробиологические питательные среды, как и из чего их делают, как оценивают качество, какие среды используют в аналитической медицинской микробиологии. Последнее, естественно, дано только выборочно. На определенных примерах показана отечественная и зарубежная практика, в том числе в таких областях, информация о которых очень бедна (фармакокинетика, биоконтроль, микробиологическая чистота лекарств).

Авторы будут благодарны за все советы и замечания по содержанию этой книги, которые просим направлять по адресу 192236, Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, 28.

## Оглавление

	Стр.
Введение	
Глава 1	Питательные среды и микробный метаболизм
Глава 2	Классификация питательных сред
Глава 3	Состав и приготовление питательных сред
Глава 4	Показатели качества и контроль питательных сред. Их хранение
Глава 5	Стерилизация питательных сред
Глава 6	Базовые питательные среды
Глава 7	Транспортные среды и буферные системы
Глава 8	Питательные среды для энтеробактерий
Глава 9	Питательные среды для анаэробных бактерий
Глава 10	Питательные среды для грибов
Глава 11	Питательные среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам
Глава 12	Питательные среды для определения микробиологической чистоты лекарств
Глава 13	Питательные среды для определения содержания антибиотиков в лекарствах и биологических субстратах
Глава 14	Другие питательные среды (для энтерококков, стафилококков, листерий, кампилобактерий, неферментирующих бактерий)

## ВВЕДЕНИЕ

Питательные среды без преувеличения могут считаться одним из основных компонентов микробиологических исследований. Современная микробиология без питательных сред существовать не может, а их качество во многом определяет информативность, точность микробиологического анализа. Число включенных в ряд руководств питательных сред (с учетом модификаций) превысило 5000 прописей, причем эта цифра вряд ли может считаться полной.

История этого раздела микробиологической науки возникла одновременно с классическими исследованиями Пастера и Коха. Особая роль принадлежит Роберту Коху. Постулировав необходимость выделения чистой культуры микроба, он тем самым определил необходимость создания условий для решения этой задачи. Важнейшим из них явилась питательная среда, на которой можно было бы получить рост микроорганизма. С именем Коха связывают внедрение в микробиологическую практику в 1881 г. плотных питательных сред. Сама идея их использования возникла раньше и принадлежит немецкому исследователю Бредфельду. Более того, еще в 1877 г. Шретер культивировал бактерии на ломтях картофеля, что также может трактоваться как применение питательной среды. Заслуга Коха заключается в глубоком научном подходе к проблеме, широком использовании питательных сред в собственных исследованиях. Им же предложен первый отвердитель — желатин, как компонент плотной среды. Привычный для современных микробиологов агар-агар был внедрен Фростом в повседневную практику значительно позже, в 1919 г., хотя справедливо было бы вспомнить, что еще в 1881 г. немецкая исследовательница Хессе предложила агар-агар. Более того, в 1913 г. русский микробиолог В.Л.Омелянский, отдавая должное питательным средам с желатином, отмечал, что агаризованные питательные среды предпочтительнее в тех случаях, когда микроб разжижает желатин.

Идеи и практическая деятельность Коха получили в конце 19 и первой четверти 20 столетий интенсивное развитие. Именно в этот период исследователи ряда стран предложили питательные среды различного назначения, роль которых для практической микробиологии была и остается весьма значительной. Современный микробиолог каждый день в своей работе вспоминает их имена. В эти немногие годы японец по происхождению Ш.Эндо предложил свой агар для дифференциации энтеробактерий, австриец Э.Левенштейн — среду для микобактерий, англичанин А.МакКонки — селективную и дифференциально-диагностическую среду для кишечных микроорганизмов, немец Т.Китт и итальянец Д.Тароцци — среду для облигатно анаэробных бактерий, француз Р.Сабуро, чех Ф.Чапек и американец А.Докс — среды для грибов, бразилец Р.Хоттингер — среды широкого назначения на основе перевара мяса и т.д.

Необходимо отметить вклад отечественных специалистов. С именем С.Н.Виноградского связано конструирование и широкое использование селективных питательных сред. В прошлом веке признание получили среды И.Е.Минкевича, Н.В.Плоскирева, И.И.Рогозина, Г.Н.Чистовича и др. российских микробиологов. К числу крупных отечественных ученых, создателей питательных сред, принадлежит работавший за рубежом А.М.Безредка.

А 20-м столетии проблема микробиологических питательных сред получила дальнейшее развитие. Внедрение противомикробных лекарственных препаратов, в первую очередь антибиотиков, потребовало широкой гаммы питательных сред для культивирования продуцентов, определения антибиотических веществ в ферментационных жидкостях, субстанциях, лекарственных формах и в биологических субстратах (при изучении фармакокинетики антибиотиков), а также для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным лекарственным средствам.

С особой остротой была поставлена задача стандартизации питательных сред, многие из которых содержат недостаточно стандартные или просто плохо стандартизуемые компоненты. В этой связи все больше заявляют о себе многокомпонентные синтетические питательные среды, одним их родоначальников которых можете быть назван Герберт (1961 г.). Их широкое применение пока сдерживают технологические и экономические вопросы, но перечень сред, содержащих частично или полностью стандартные компоненты, неуклонно увеличивается.

Тем не менее, проблема микробиологических питательных сред, в том числе для клинической практики, остается актуальной, а сама сложившаяся ситуация имеет ряд негативных моментов. Это и уже упомянутая недостаточная стандартность многих питательных сред. Качество серийных образцов в некоторых случаях оставляет желать лучшего, а внутрилабораторный контроль питательных сред, как система, пока не внедрен. Вызывает сожаление узкий круг

номенклатуры используемых сред, о некоторых из них, эффективных, с высокой избирательностью ростовых свойств, неправомерно забывают. Безусловно, это чаще всего связано с экономическими причинами. Но, в ряде случаев, отрицательную роль играет информационный вакуум. Питательным средам в руководствах и учебниках по микробиологии уделяется очень мало места. Специалистов данной области микробиологических знаний не готовят.

Вот почему настоящее издание может оказаться полезным и в какой-то, пусть небольшой степени, поможет врачам-микробиологам глубже заглянуть в сложный мир микробиологических питательных сред, напомним им об основных понятиях и терминах в области средоварения, требованиях к питательным средам, рецептуре ряда наиболее употребляемых вариантов сред.

## **ГЛАВА 1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И МИКРОБНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ**

Для процессов роста и размножения микроорганизмы должны получать все вещества, которые необходимы для биосинтеза клеточных компонентов и получения энергии. Эти вещества, называемые питательными, должны содержаться в культуральной (питательной) среде, при этом в количествах, соответствующих специфическим потребностям данного микроорганизма.

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор состава среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов, получения чистых культур, изучения их морфологических и физиологических особенностей, идентификации, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний и многое другое.

Так как физиология микроорганизмов крайне многообразна, а, следовательно, так же многообразны и их специфические потребности в питательных веществах, для культивирования микроорганизмов предложены тысячи различных по составу питательных сред. Качественный диапазон этих сред весьма широк — от растворов минеральных солей, на которых могут расти автотрофы, до сложных, приготовляемых из мясных гидролизатов, обогащенных кровью или сывороткой и используемых для выделения и культивирования особо требовательных микроорганизмов, например, патогенных, типа стрептококков, легионелл, микоплазм и др.

Для того, чтобы ориентироваться в таком многообразии питательных сред их издавна классифицируют с различных позиций: по физическому состоянию, составу, по назначению — для культивирования, изоляции, идентификации, хранения определенных видов микроорганизмов и др.

Многие из сред стали «классическими», их преимущества были подтверждены в результате длительного и широкого использования в различных областях микробиологии. К ним, например, относятся среды МакКонки и Плоскирев, сочетающие селективные и дифференциально-диагностические свойства при исследовании содержимого кишечника; среда Китт-Тароцци для анаэробов, в первую очередь патогенных клостридий, среда Блаурокка для бифидобактерий, среды Чапека и Сабуро для культивирования дрожжеподобных и мицелиальных грибов.

Не взирая на существующее множество сред и в настоящее время проводятся исследования по их оптимизации и созданию новых на базе современных представлений о метаболизме отдельных видов микроорганизмов. Универсальных сред, одинаково пригодных для всех микроорганизмов, не существует.

Качественно-количественный состав питательных сред часто подбирается эмпирически, без обоснования использования тех или иных компонентов, однако в настоящее время эта проблема решается, главным образом, на основе современного уровня знаний микробного метаболизма.

Элементы, которые в первую очередь необходимы для роста микроорганизмов и должны включаться в состав питательной среды, определены из химического состава микробных клеток, который, в принципе, одинаков у всех живых организмов.

Основная часть общей массы клеток представлена водой (80 – 90%) и только 10 – 20% приходится на сухое вещество. По количественному содержанию в сухом веществе выделяют макро- и микроэлементы. К числу первых относятся: углерод, кислород, азот, водород, сера, фосфор, калий, натрий, магний, кальций, железо. К микроэлементам — марганец, молибден, цинк, медь, кобальт и др., большинство из которых необходимо в следовых количествах. По этой причине в состав многих сред микроэлементы не добавляют, так как потребность в них может

быть удовлетворена за счет примесей в солях макроэлементов. Кроме того, не все микроорганизмы нуждаются в микроэлементах.

И если потребность микроорганизмов в минеральных элементах определить сравнительно просто, тем более что она во многом сходна у большинства организмов, потребность в углероде и азоте — важнейших биогенных элементах, определить значительно сложнее. Это обусловлено тем, что микробный метаболизм, как конструктивный (биосинтетический), так и энергетический отличается чрезвычайным разнообразием, которое, в свою очередь, является результатом способности микроорганизмов использовать в качестве источника углерода и энергии широкий набор органических и неорганических соединений. В основе метаболического разнообразия лежат и разные биохимические пути метаболизирования исходных субстратов, т. е. один и тот же субстрат в зависимости от условий может метаболизироваться различными путями.

В отличие от животных и растительных организмов, микроорганизмы характеризуются разнообразием и типов питания, которые выделяют по трем основным критериям — источник углерода, источник энергии и донор электронов (водорода).

В зависимости от природы источника углерода все микроорганизмы разделены на 2 большие группы — автотрофы, использующие углекислоту, и гетеротрофы, требующие для роста и размножения готовых органических веществ. С учетом разнообразия источников энергии и доноров электронов эти группы подразделены на подгруппы, в результате чего у микроорганизмов выделены 8 типов питания. Каждый тип питания характерен для определенных микроорганизмов и отражает их физиолого-биохимические свойства.

Большинство микроорганизмов, в том числе и патогенных, имеют тип питания, при котором источником углерода, энергии и донорами электронов являются органические вещества.

Потребности микроорганизмов в органических источниках углерода весьма разнообразны. Некоторые виды являются «всеядными» и могут потреблять различные по химической природе вещества, другие отличаются большей избирательностью и используют лишь некоторые из них.

Специфичность набора органических соединений, свойственного каждому виду микроорганизмов, учитывается при создании элективных и дифференциально-диагностических сред, широко применяемых в санитарной и клинической микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

При выборе углеродсодержащего субстрата необходимо учитывать, что усвояемость органических веществ в значительной степени зависит и от их свойств — растворимости, степени окисленности атомов углерода, пространственной конфигурации и полимеризации их молекул. Обычно микроорганизмы усваивают определенные оптические изомеры — сахара, относящиеся к D-ряду, аминокислоты — к L-ряду. Очень мало микроорганизмов обладают ферментами, под действием которых один оптический изомер превращается в другой.

Использовать такие биополимеры как крахмал, полисахариды, белки, жиры могут только те микроорганизмы, у которых синтезируются определенные гидролитические ферменты — амилазы, протеазы, липазы в форме экзоферментов, т.е. ферментов, выделяемых клеткой в среду обитания.

Процесс потребления полимеров начинается с их ферментативного гидролиза до более низкомолекулярных водорастворимых продуктов, которые легко попадают в клетку и подвергаются биохимическим превращениям в конструктивном и энергетическом метаболизмах.

Для подавляющего большинства гетеротрофных микроорганизмов основными, легко доступными источниками углерода и энергии являются углеводы, аминокислоты, белки, органические кислоты.

Характеризуя потребность микроорганизмов в органических источниках углерода следует отметить, что наибольшая степень гетеротрофности присуща патогенным микроорганизмам, приспособившимся к жизни в организме человека и животных. Состав питательных сред для их культивирования особенно сложен. Они содержат белки или продукты их неглубокого гидролиза (пептиды), витамины, фрагменты нуклеиновых кислот и др. Для приготовления таких сред используют различного типа гидролизаты и экстракты мяса, кровь или сыворотку, дрожжевые и растительные экстракты и многое другое.

Эти среды пригодны для культивирования самых разных видов и особенно удобны в тех случаях, когда неизвестна потребность микроба в факторах роста или он нуждается во многих факторах роста одновременно. Недостатком таких сред является сложность или невозможность достижения их стандартности из-за нестандартности и ограниченной контролируемости состава и свойств исходного сырья.

Многие гетеротрофные микроорганизмы нуждаются не только в органическом, но и в неорганическом источнике углерода — углекислоте. Так как микроорганизмы, использующие органический субстрат, образуют углекислоту в значительных количествах, потребность в ней для биосинтеза может быть удовлетворена и за счет этого источника. Тем не менее, удаление углекислоты из среды часто задерживает, а иногда и полностью подавляет рост микроорганизмов. Для некоторых бактерий и грибов требуются относительно высокие концентрации углекислоты в атмосфере (5 – 10%).

### **Микробный метаболизм**

Органическое вещество, поглощенное клеткой, вовлекается в метаболические процессы.

Клеточный метаболизм микроорганизмов складывается из двух потоков биохимических реакций, имеющих разную направленность и составляющих соответственно суть энергетического (катаболизма) и конструктивного (анаболизма) метаболизмов.

В реакциях энергетического метаболизма, в результате окисления органического субстрата, образуется энергия, которая запасается в клетках в форме АТФ, и используется в процессах биосинтеза и для осуществления других жизненных функций.

В реакциях конструктивного метаболизма происходит синтез макромолекул, составляющих основную массу клетки, из более простых соединений внеклеточной среды или образующихся в клетке в процессах катаболизма.

Реакции катаболизма и анаболизма тесно взаимосвязаны и представляют собой две стороны единого метаболизма, которые можно разделять с большой долей условности. В силу этого органическое вещество в составе питательной среды, как правило, выполняет двоякую функцию, являясь одновременно и источником углерода и источником энергии.

Однако нередко для конструктивного обмена могут использоваться одни вещества, а для энергетического другие. Так, уксуснокислые бактерии получают энергию путем окисления этанола, но не могут его использовать для синтеза клеточных компонентов; гомоферментативные молочнокислые бактерии энергию получают при сбраживании сахаров, а для конструктивных процессов им необходимы готовые аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, которые они не могут синтезировать сами.

**Конструктивный метаболизм** микроорганизмов в целом направлен на синтез четырех основных типов биополимеров — белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и липидов. Для биосинтеза белков и нуклеиновых кислот важнейшим элементом, кроме углерода, является азот.

Самым доступным источником азота для большинства микроорганизмов являются ионы аммония, которые они могут получать из солей органических и неорганических кислот, аминокислот, белков и других азотсодержащих веществ. Для многочисленной группы бактерий, главным образом патогенных, в качестве источников азота необходимы азотсодержащие органические вещества.

Если таким источником азота являются аминокислоты, микроорганизмы могут их использовать непосредственно для синтеза белков, либо предварительно осуществить их дезаминирование, а выделившиеся при этом аминогруппы использовать для синтеза собственных аминокислот, белков.

Однако, для роста некоторых микроорганизмов необходимы определенные аминокислоты, которые они не могут синтезировать сами. К числу микроорганизмов, нуждающихся в таких «незаменимых» аминокислотах, относятся золотистый стафилококк, гемолитический стрептококк, молочнокислые бактерии и некоторые другие. В зависимости от физиологических особенностей микробов, количество «незаменимых» аминокислот различно — для золотистого стафилококка обязательно наличие в питательной среде лишь триптофана и цистина, а для гемолитического стрептококка — 17 аминокислот.

Белки, как источники азота, доступны только тем микроорганизмам, которые образуют протеолитические ферменты, выделяемые в среду (т.е. в экзоформе). Под действием этих ферментов белки расщепляются до более низкомолекулярных веществ — пептонов и аминокислот.

Биохимические реакции, в ходе которых синтезируются белки и нуклеиновые кислоты в принципе сходны у микроорганизмов различных систематических групп.

Значительные различия наблюдаются, главным образом, в биохимических путях синтеза полисахаридов и липидов, в силу чего химический состав и структура этих соединений часто характерны для определенных таксономических групп.

Источники всех других элементов, необходимых для конструктивного метаболизма (фосфора, серы, водорода, калия, натрия и др.) являются практически общими для всех микроорганизмов и представлены солями неорганических кислот, водой.

**Энергетический метаболизм** микроорганизмов, как и конструктивный, характеризуется разнообразием биохимических механизмов. В этом метаболизме различают три основных типа — аэробное дыхание, анаэробное дыхание и брожение, наиболее распространенным из которых является аэробное дыхание. В этом процессе органическое вещество окисляется до углекислоты и воды с максимальным выделением энергии, заключенной в этом веществе. Многие микроорганизмы с аэробным дыханием — строгие аэробы, однако некоторые из них относятся к факультативным аэробам, поскольку они могут образовывать АТФ и в анаэробных условиях — путем брожения.

Некоторые микроорганизмы, главным образом бактерии, получают энергию в анаэробном дыхании, т.е. в результате окисления веществ, где в качестве акцепторов электронов выступает не кислород, а неорганические соединения. Так, отдельные виды рода *Bacillus*, *E. coli* осуществляют анаэробное дыхание, в процессе которого нитрат ( $\text{NO}_3$ ) восстанавливается до аммиака; *Clostridium acetivum* окисляет молекулярный водород, используя в качестве акцептора электронов углекислоту.

Круг органических соединений, которые могут подвергаться окислению, очень широк, необходимо только, чтобы степень их окисленности была бы меньше, чем у углекислоты.

Простейшим по метаболизму типом энергетического метаболизма является брожение. Процессы брожения протекают в анаэробных условиях и сопровождаются выделением энергии. Основным субстратом брожения являются углеводы, однако бактерии могут сбраживать органические кислоты, в том числе и аминокислоты, а также пурины и пиримидины.

Известно много типов брожения, каждый из которых вызывается особой группой микроорганизмов и в соответствии с механизмом сопровождается образованием специфических конечных продуктов. Конечными продуктами брожений обычно являются различные органические кислоты — молочная, уксусная, янтарная, лимонная и др., а также спирты (этиловый, бутиловый, пропиловый), углекислый газ и водород. По выходу основного конечного продукта выделяют и соответствующие типы брожения.

В силу того, что при брожении не происходит полного окисления субстрата и в среду выделяются частично окисленные вещества, еще содержащие энергию — органические кислоты, спирты и др., общий выход АТФ в этом процессе на 1 моль сбраживаемого субстрата значительно (~ в 30 раз) ниже, чем при метаболизме того же субстрата в процессах дыхания.

Основная часть энергии, получаемая в любом энергетическом метаболизме, расходуется в процессах биосинтеза клеточных компонентов.

Таким образом, из краткой информации, представленной выше, о пищевых потребностях микроорганизмов, особенностях и многообразии их конструктивного и энергетического метаболизма следует, что выбор или разработка новых питательных сред для культивирования микроорганизмов должны основываться на точном знании физиологии каждого конкретного вида.

Тем не менее, для всех сред, не взирая на их разнообразие и многочисленность, выделяются общие основные требования, которые необходимо учитывать при разработке и приготовлении питательных сред. К их числу относятся следующие требования:

- Среды должны содержать все необходимые источники питания в оптимальных для данного микроорганизма концентрациях — недостаток или избыток питательных элементов оказывает негативное действие; в некоторых случаях среды должны содержать специальные факторы роста.
- В составе среды все источники питания должны быть представлены в такой форме, в которой микроорганизмы способны их усваивать.
- Основные компоненты среды (источники углерода, азота, фосфора, серы, калия) должны содержаться в соотношениях, приблизительно соответствующих соотношениям их в клетках.
- Среды, в зависимости от вида культивируемого микроорганизма, должны иметь определенный уровень кислотности — рН, при котором наиболее активно протекают процессы его жизнедеятельности. Повышенной чувствительностью к рН среды отличается большинство патогенных микроорганизмов, активный рост которых наблюдается в сравнительно узком диапазоне значений этого фактора — 7,0 – 7,4.



- Среды должны иметь определенный уровень окислительно-восстановительного потенциала (Eh), который зависит от состава питательной среды, степени насыщения ее кислородом, а также от уровня pH — чем ниже pH, тем выше Eh и наоборот. Как и в случае с pH, пригодность среды для тех или иных микроорганизмов, независимо от ее состава, может определяться уровнем и этого фактора — Eh.
- Среды должны быть изотоничными для микробных клеток, то есть осмотическое давление в среде должно быть практически таким же, как внутриклеточное.
- Среды должны быть стерильными.

Кроме вышеуказанных требований, являющихся общими, практически для всех сред, имеются и многие другие, касающиеся, например, тех свойств среды, которые могут затруднить или сделать некорректными визуальный контроль за процессами жизнедеятельности микроорганизмов (это цветность, прозрачность, консистенция и др.).

Следует отметить, что иногда рост микроорганизмов отсутствует при посеве их на питательную среду, считающуюся удовлетворительной, например, на питательный бульон. Причины этого явления в основном остаются неизвестными, идентифицированы только некоторые ингибиторы, к которым относятся жирные кислоты и перекиси.

Жирные кислоты содержатся почти во всех материалах, используемых в микробиологии - в пептоне, агаре, казеине, вате и др. В составе питательных сред они подавляют или ограничивают рост многих видов микроорганизмов, в том числе патогенных, например, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* и др. Для удаления жирных кислот в среду добавляют какое-либо вещество, связывающее жирные кислоты — 0,5% активированного угля или 0,15% растворимого крахмала, или 10% (объемных) сыворотки.

Перекиси обнаруживаются в средах, подвергнутых ультрафиолетовому облучению или находящихся на свету, а в некоторых средах после автоклавирования.

Содержание перекисей в питательных средах варьирует, вследствие чего в одних случаях наблюдается ингибирование только штаммов, не содержащих каталазу, тогда как в других не растут даже штаммы, продуцирующие ее.

Ингибиторы роста микроорганизмов могут образовываться под действием различных, часто неизвестных факторов в процессе приготовления и нагревания сред. Значительным ингибирующим эффектом обладают глюкозофосфаты, образующиеся в процессе нагревания среды; комплекс, содержащий медь и пептон и др.

## ГЛАВА 2. КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Для того, чтобы ориентироваться в большом многообразии питательных сред как по составу, так и по назначению было предложено несколько их классификаций.

**По составу** питательные среды для культивирования микроорганизмов делятся на две группы — натуральные и синтетические. Для практических исследований широко используют **натуральные (естественные) среды**, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения и имеют неопределенный химический состав. К таким средам относятся овощные или фруктовые соки, животные ткани, кровь, молоко, яйца, желчь, сыворотка крови, а также отвары и экстракты, полученные из различных природных субстратов — мяса, различных частей растений, почвы. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в таких средах имеются, как правило, все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако эти среды имеют сложный непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения физиологии, обмена веществ микроорганизмов, так как в значительной степени не позволяют учесть потребление компонентов среды и образование продуктов обмена по ходу развития. Натуральные среды используются, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. Примерами натуральных сред неопределенного состава, которые широко применяются в лабораторной практике, служат мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, картофельные среды и мн.др.

К числу натуральных сред неопределенного состава относят и так называемые **полусинтетические среды**, в состав которых, наряду с соединениями известной химической

природы, входят вещества неопределенного состава. К полусинтетическим средам относятся, например, мясо-пептонный бульон с глюкозой, среда Эндо, среда Сабуро и т.п.

К полусинтетическим средам следует относить также среды, которые содержат соединения известного состава — углеводы, нитраты, фосфаты и другие и, в незначительных количествах, соединения неопределенного состава — гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, добавляемые в качестве факторов роста.

Питательные среды являются **синтетическими**, если содержат только химически чистые соединения в точно указанных концентрациях, т.е. состав их полностью известен. Достоинством таких сред являются стандартность и воспроизводимость с высокой степенью точности. Эти среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов.

Для разработки синтетических сред необходимо знать потребности микроорганизмов в источниках питания и основные особенности их обмена веществ. Существует большое количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам натуральным средам неопределенного состава. Однако только для немногих патогенных бактерий имеются синтетические среды. Их применяют, главным образом, для экспериментального изучения метаболизма микроорганизмов, реже для аналитических целей, диагностики и хранения культур.

**По назначению** различают питательные среды общего назначения (универсальные) и специальные питательные среды.

Питательные среды **общего назначения** пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и могут применяться в качестве основы для приготовления специальных питательных сред. К ним относятся, например, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, сусло жидкое, сусло-агар и др.

**Специальные** питательные среды предназначены для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения. Различают следующие виды специальных сред: элективные (избирательные), дифференциально-диагностические (индикаторные), консервирующие.

Элективные среды применяются, главным образом, для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания или для поучения накопительных культур. Эти среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов. Избирательность питательной среды для определенных видов микроорганизмов достигается путем создания оптимальных для них условий (рН, Eh, концентрация солей, состав питательных веществ), т.е. положительной селекцией, или путем добавления в среду веществ, угнетающих другие микроорганизмы (желчь, азид натрия, теллурид калия, антибиотики и др.), т.е. отрицательной селекцией. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их в значительной степени задерживается.

Дифференциально-диагностические среды применяют для изучения биохимических свойств и дифференцировки одного вида (рода) микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида. Дифференцирующие свойства питательной среды создаются внесением субстрата, к которому определяется отношение микроорганизма (например, сахаров, аминокислот и др.), соответствующих индикаторов (например, рН-индикаторов – бромтимолблау, фуксин и др.; Eh-индикаторов).

Консервирующие (транспортные) среды используются широко в клинической практике для сохранения жизнеспособности микроорганизмов в период от момента взятия биоматериала до посева. Основная цель их использования — сохранить жизнеспособность возбудителя и предотвратить размножение сопутствующей микрофлоры в период транспортировки образцов.

По консистенции питательные среды бывают жидкие, полужидкие, плотные, сыпучие и сухие.

**Жидкие** среды чаще применяют для изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

**Полужидкие** среды обычно используют для хранения культур, реже — для накопления биомассы (например, анаэробов).

**Плотные** среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, изучения морфологии колоний, диагностических целей, для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и в ряде других случаев.

**Сыпучие** среды обычно используют для хранения посевного материала, культур-продуцентов в микробиологической и медицинской промышленности. К ним относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

**Сухие питательные среды** представляют собой порошки или гранулы с влажностью, не превышающей 10% и легко растворимые в воде. Они выпускаются по соответствующим технологиям на производствах в различных масштабах, удобны для хранения, транспортировки и приготовления готовых к употреблению сред.

### ГЛАВА 3. СОСТАВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Питательные среды для культивирования микроорганизмов должны содержать все элементы, необходимые для их роста, в определенных концентрациях, определенной химической форме и в том количественном соотношении, в каком они находятся в клетках.

Основной качественно-количественный состав питательных сред, как правило, и определяется с учетом химического состава микробной биомассы, который в общих чертах одинаков у всех организмов.

Как следует из химического состава бактерий, представленного на примере бактериальной культуры *E.coli* (табл.1), важнейшими элементами являются: углерод, кислород, водород, азот, фосфор, сера, на долю которых приходится до 95% от веса сухих клеток.

Таблица 1

#### Усредненный элементный состав микробной клетки (бактерии *E.coli*)

№ п/п	Элемент	Содержание, % от сухого вещества	№ п/п	Элемент	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
			13.	Все остальные элементы	~ 0,3

Эти элементы относятся к числу важнейших по тем физиологическим функциям, которые они выполняют, а, следовательно, в первую очередь необходимы для микроорганизмов (табл.2).

Некоторое исключение составляет натрий. Несмотря на то, что он постоянно и сравнительно в больших количествах обнаруживается в минеральном остатке микроорганизмов, относительно его физиологической роли мало что известно.

#### Источники элементов, используемые для приготовления питательных сред

В вопросе об источниках указанных выше элементов (табл.2) следует отметить особую роль воды. Вода составляет 80 – 90% от клеточной массы микроорганизмов и играет важнейшую роль в их физиологических функциях. Она входит в состав структурных элементов клетки, служит средой для биохимических реакций, источником кислорода в процессах метаболизма, непосредственно участвует в метаболических реакциях, например в реакциях гидролиза.

Являясь хорошим растворителем, вода обеспечивает поступление питательных веществ в клетку.

Вода — важнейший компонент всех питательных сред.

В отсутствии влаги замедляются или полностью прекращаются процессы жизнедеятельности микроорганизмов. В зависимости от степени чувствительности к этому фактору некоторые из них переходят в состояние анабиоза, другие погибают.

Отмечается, что устойчивость к отсутствию влаги у шаровидных и грамположительных бактерий выше, чем у палочковидных и грамотрицательных..

Таблица 2

### Основные физиологические функции важнейших элементов

Элемент	Физиологическая функция
Углерод	Входит в состав всех органических веществ клетки.
Кислород	Входит в состав воды, органических веществ клетки; в виде O <sub>2</sub> является акцептором электронов при аэробном дыхании.
Азот	Входит в состав белков, нуклеиновых кислот, коферментов.
Водород	Входит в состав воды и всех органических веществ клетки
Фосфор	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов, участвует в процессе дыхания (образование АТФ)
Сера	Входит в состав белков (в аминокислотах цистеине и метионине) и некоторых коферментов (КоА, кокарбоксилазы и др.).
Калий	Один из главных неорганических катионов клетки, кофактор для некоторых ферментов.
Кальций	Важный катион клетки, кофактор для некоторых ферментов (например, протеиназ).
Магний	Важный катион клетки; неорганический кофактор для многих ферментативных реакций, в том числе для реакций с участием АТФ; участвует в связывании ферментов с субстратами.
Железо	Входит в состав цитохромов и других белков, кофактор для некоторых ферментов.
Марганец	Неорганический кофактор для некоторых ферментов, иногда может заменить магний.
Кобальт	Входит в состав витамина В <sub>12</sub> и его производных, являющихся коферментами.
Медь, цинк, молибден	Неорганические компоненты некоторых ферментов.

### Источники углерода и азота

Для подавляющего большинства микроорганизмов (гетеротрофов) источниками углерода являются готовые органические вещества, многие из которых одновременно являются и источниками азота (белки, аминокислоты и др.).

К этой, основной по численности группе микроорганизмов относятся и патогенные, у которых гетеротрофность выражена в наибольшей степени.

Общепотребительными источниками углерода и азота с повышенной питательной ценностью являются различные продукты специальной обработки мяса животных, главным образом, крупного рогатого скота, конины, а также казеина, дрожжевой биомассы, соевых бобов и др.

Основными продуктами, получаемыми из мяса животных и используемыми для изготовления питательных сред являются — мясная вода, мясной экстракт, ферментативные и кислотные гидролизаты.

**Мясную воду** (мясной настой, мясной инфуз) получают из фарша, приготовленного из очищенной мышечной ткани. К фаршу добавляют воду в отношении 1 : 2 и оставляют при 4 – 10°С на 18 – 24 ч, после чего смесь кипятят в течение 1 часа и фильтруют для отделения фарша.

Для увеличения концентрации мясной воды соотношение мясного фарша и воды можно менять до 1 : 1 и меньше, а при последующем изготовлении среды ее соответственно разводят. При

использовании мяса низкого качества рекомендуется соотношение 1 : 1 и такую мясную воду используют без разведения.

В мясной воде (1 : 1) должно содержаться (% , масс): общего азота — 0,3; аминного — 0,07; сухих веществ — 2,4 – 2,8; белка — 0,45.

Для приготовления широко используемых сред — МПБ и МПА к мясной воде добавляют пептон и натрия хлорид в концентрациях 1 и 0,5% соответственно.

Для культивирования патогенных микроорганизмов, особенно требовательных к питательным средам, к мясо-пептонным средам добавляют различные, обогащающие их компоненты — кровь, сыворотку, сахар, яичный желток и др.

**Мясной экстракт** получают, главным образом, при продолжительной варке мясного фарша в автоклаве с последующей выпаркой мясного бульона в вакуум-аппарате до образования пастообразного продукта.

Такой продукт содержит воды 18%, органических веществ — 61%, минеральных — 21%.

Мясные экстракты выпускают и в виде сухих порошков, легко растворимых в воде и содержащих в среднем 12% общего азота, 1,1% аминного азота, 15,6% минеральных веществ.

При приготовлении питательных сред мясную воду часто заменяют мясным экстрактом несмотря на то, что они отличаются не только технологиями их получения, но и составом; при получении экстракта теряются термолабильные вещества, содержащиеся в мясной воде.

## Пептоны

Важнейшим компонентом многих питательных сред являются пептоны — продукты ферментативного гидролиза белков мяса.

В микробиологической практике в основном применяются пептоны, получаемые с помощью пепсина, панкреатина, трипсина, используемых как в виде частично очищенных, так и «сырых» препаратов. К числу «сырых» препаратов относятся измельченные ткани желудков свиней и поджелудочных желез свиней и рогатого скота.

Под действием указанных ферментов образуются пептоны, полипептиды различной степени сложности и свободные аминокислоты, однако, следует учитывать, что пептоны, получаемые с использованием препаратов, содержащих пепсин и препаратов, содержащих панкреатин, различаются по глубине гидролиза белков.

Пепсинные пептоны (пептон, пепсин-пептон, пептон по Рамону, он же Thitone, Pepton, Bio-Thione, Peptamin и др.) содержат в большом количестве высокомолекулярные полипептиды — продукты неглубокого гидролиза белков.

Панкреатические пептоны (панкреатический перевар мяса, триптический перевар мяса, триптон, он же Myosate, Amber МРН, ОМ-НА РОМ, Peptone, Proteose-Peptone и др.) представляют собой смесь продуктов более глубокого гидролиза — простых полипептидов, пептонов и большого количества свободных аминокислот, о чем свидетельствует и высокое содержание в этих пептонах аминного азота — до 1200 мг%.

Известно много способов получения пептонов, как пепсинного, так и панкреатического, используемых для культивирования отдельных видов микроорганизмов, с учетом их специфических особенностей.

Пептоны выпускают, главным образом, в сухом виде — в виде желто-бежевого порошка.

Пептоны характеризуются высокой питательной ценностью для микроорганизмов, но одновременно и значительным недостатком, а именно — нестандартностью. Повышенная вариабельность пептонов по составу и питательной ценности обуславливается не только нестандартностью исходного сырья — мяса, но нестандартностью источников ферментов — желудков, поджелудочных желез, получаемых от разных животных, хранящихся в разных условиях и т.д.

В качестве питательных компонентов многих сред (питательных бульонов, питательных агаров и др.) могут быть использованы не только гидролизаты мяса, но и других белковых субстратов — казеина, рыбных продуктов, растительных белков.

**Рыбные продукты** с успехом используются для получения высокопитательных сред для микроорганизмов, так как по химическому составу мясо животных практически не отличается от мяса рыб.

В нашей стране выпускаются в сухом виде и широко применяются в микробиологической практике общеупотребительные среды на основе панкреатического гидролизата кильки — питательный бульон (СПБ) и питательный агар (СПА).

**Казеин** — фосфорсодержащий белок, получаемый из обезжиренного молока и являющийся наиболее полноценным видом сырья для питательных сред. От других источников белка отличается постоянством состава, содержит все аминокислоты и некоторые витамины.

Панкреатический гидролизат казеина (триптический гидролизат, панкреатический перевар, триптический пептон, панкреатический пептон казеина) получают с использованием ферментов поджелудочной железы, пептический — с использованием пепсина.

Ферментативные гидролизаты казеина содержат низкомолекулярные пептиды, аминокислоты, в том числе и триптофан, соотношение которых в составе гидролизатов варьирует в зависимости от способа их получения.

В настоящее время известно много способов и их различных модификаций для получения таких гидролизатов.

Кислотные гидролизаты казеина получают использованием высоких температур (110°C и выше) и крепкой соляной кислоты, при этом достигается почти полный его гидролиз до аминокислот. Однако при этом разрушаются углеводы, триптофан, цистин и частично треонин и серин, а содержание натрия хлорида увеличивается до 38 – 40%.

Ферментативные и кислотные гидролизаты казеина выпускаются в виде сухих порошков.

Питательные среды на основе различных гидролизатов казеина используются в диагностике инфекционных заболеваний.

В качестве источника углерода, азота и других компонентов для многих общеупотребительных и специальных питательных сред используются продукты, получаемые из **дрожжей**: дрожжевая вода, дрожжевой настой, дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, кислотные и ферментативные гидролизаты дрожжей.

Для получения этих продуктов используют главным образом хлебопекарные дрожжи рода *Saccharomyces* и кормовые родов *Candida* и *Torulopsis*.

Дрожжи содержат до 53% белка, 25 – 40% углеводов и являются богатым источником витаминов группы В, витамина Д, и других факторов роста — пуриновых и пиримидиновых оснований. Белок дрожжей сбалансирован по аминокислотному составу и по этому показателю близок к животному белку.

Наиболее широко используемыми и получаемыми в промышленных масштабах являются дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат и гидролизаты дрожжей.

**Дрожжевой автолизат.** Дрожжевые клетки содержат значительное количество различных протеолитических ферментов (пепсины, трипсазы, эритазы и др.), под действием которых в определенных условиях происходит автолиз клеток и высвобождение из них белков в виде пептонов, альбумоз, а также аминокислот, нуклеиновых кислот и др. Эти компоненты и определяют состав автолизата, который сопоставим с триптическим гидролизатом других белков, в том числе и по содержанию аминного азота. Содержание аминного азота дрожжевого автолизата достигает 1000 – 1200 мг%.

Дрожжевые экстракты представляют собой водные экстракты из дрожжей, которые предварительно гидролизуют или подвергают автолизу.

Дрожжевой экстракт и дрожжевой автолизат выпускаются в виде густых сиропов или в виде сухих мелкодисперсных порошков.

**Гидролизаты дрожжей** получают с помощью ферментов или кислот. Ферментативные гидролизаты получают с использованием поджелудочной железы или панкреатина, кислотные — с использованием фосфорной или соляной кислот.

По основному химическому составу, а именно содержанию общего и аминного азота, пептонов, триптофана, дрожжевые гидролизаты сходны с мясными гидролизатами, к тому же пептонов в дрожжевых гидролизатах больше, чем в мясных.

На бульонах из гидролизатов дрожжей хорошо проявляется рост энтеробактерий, кокков и коринебактерий.

В качестве основ для питательных сред используют продукты, получаемые из растительного сырья и, прежде всего, из бобов сои, богатых белком, витаминами, минеральными веществами. Из значительного числа таких продуктов преимущественное использование в практике изготовления питательных сред нашли **ферментативные и кислотные гидролизаты**

**сои** (пептоны). Ферментативный гидролиз осуществляют с использованием пепсина, папаина, панкреатина, а кислотный — соляной кислоты.

Высокая питательная ценность этих гидролизатов (пептонов) подтверждается тем, что, например, на средах с папаиновым гидролизатом сои и без добавления сыворотки и факторов роста, хорошо растут стрептококки, гонококки и другие требовательные бактерии. Соевый бульон в некоторых случаях может заменить мясной бульон.

Соевые гидролизаты в различных странах выпускают под названиями: Phytone, Soytone, Soya Pentone, bio-Soyase.

Таким образом, все вышеуказанные продукты обработки мяса животных, рыбы, казеина, дрожжей, растительного сырья представляют собой органические источники углерода и азота. Однако для многих микроорганизмов легкоусвояемым источником азота является аминный азот различных неорганических солей аммония.

### **Источники фосфора, серы и металлов**

Источниками фосфора — важнейшего биогенного элемента служат, в основном, фосфаты калия и натрия, а из органических соединений — пуриновые и пиримидиновые основания.

Источниками серы для одних микроорганизмов могут быть сульфаты различных металлов (окисленная форма серы), для других — тиосульфаты (восстановленная форма серы).

Основным органическим источником серы являются аминокислоты цистеин, метионин.

Все металлы — калий, магний, натрий, железо (макроэлементы) микроорганизмы получают в виде катионов неорганических солей.

Другие минеральные элементы — кобальт, марганец, молибден, медь, цинк (микроэлементы) в среды не добавляют, т.к. они в достаточном для микроорганизмов количестве присутствуют в виде примесей к макроэлементам, а также в воде.

Кислород и водород — наиболее доступные для микроорганизмов элементы. Они входят в состав воды, многих солей, всех органических соединений. Однако многим микроорганизмам и, прежде всего, строгим аэробам, необходим и молекулярный кислород ( $O_2$ ), поступающий из воздуха.

**Факторы роста** (ростовые вещества). Для роста и размножения некоторых микроорганизмов, кроме источников углерода, энергии и минеральных элементов, требуются вещества, названные факторами роста. К ним относятся аминокислоты, витамины, пуриновые и пиримидиновые основания. Эти вещества необходимы всем микроорганизмам, однако многие (прототрофы) синтезируют их сами, другие (ауксотрофы) не способны к синтезу одного или нескольких факторов и для обеспечения их роста недостающее соединение должно быть внесено питательную среду

Так, некоторые микроорганизмы не могут синтезировать ряд аминокислот и строят свои белки (растут) только тогда, когда эти недостающие «незаменимые» аминокислоты содержатся в среде. В зависимости от физиологических особенностей микроорганизмов количество незаменимых для них аминокислот различно. Для палочек тифа и ботулизма необходима одна — триптофан, для золотистого стрептококка две — триптофан и цистеин, для молочнокислых — 16, а для гемолитического стрептококка — 17.

Парааминобензойная кислота является ростовым фактором многих патогенных бактерий — пневмококков, гонококков, возбудителей дизентерии, а никотинамид (витамин  $B_5$ ) — для золотистого стафилококка и др.

Ростовые вещества нужны микроорганизмам в ничтожно малых количествах: аминокислоты — 10 мкг/мл, пурины и пиримидины — 10 мкг/мл, витамины — 1 мкг/мл среды.

Факторы роста в среду можно вносить в виде индивидуальных веществ, однако, как правило, для этих целей используют дрожжевую воду, дрожжевые экстракты и автолизаты, гидролизаты мяса, казеина.

Использовать эти сложные по составу источники ростовых факторов особенно удобно тогда, когда не известна потребность культуры в каком-то конкретном факторе или она нуждается в нескольких факторах одновременно.

### **Физико-химические показатели питательных сред (рН и Eh)**

Важнейшим свойством всех питательных сред, влияющим на процессы жизнедеятельности микроорганизмов, является их кислотность (щелочность), выражаемая как отрицательный логарифм концентрации водородных ионов — рН.

рН оказывает влияние на процессы диссоциации кислот и оснований в среде, растворимость питательных веществ, транспорт их в клетку, на активность ферментов и многое другое, определяя тем самым возможность роста микроорганизмов даже на оптимальной по составу среде.

Для подавляющего большинства микроорганизмов, в том числе и патогенных, благоприятной для роста и размножения является нейтральная реакция среды (рН  $7,0 \pm 0,5$ ), хотя эти процессы с той или иной интенсивностью могут проходить и в более широком диапазоне значений этого фактора.

Некоторые представители из сапрофитных бактерий хорошо растут при рН 8,2 – 8,5, другие при рН 4,0 – 5,0.

Мицелиальные грибы и дрожжи являются ацидофильными организмами и предпочитают слабокислые значения рН — 4,0 – 6,0.

Уровень рН необходимо контролировать не только после приготовления среды и после стерилизации, но и непосредственно перед использованием, так как рН среды может измениться в процессе ее хранения.

До нужного значения этот фактор доводят с использованием растворов кислот (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), щелочей (NaOH, KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>).

Учитывая, что в процессе роста микроорганизмов в среду могут выделяться метаболиты (кислые или щелочные), изменяющие рН, в состав сред часто добавляют буферные смеси, преимущественно фосфатные буферы, обладающие максимальной буферной емкостью в физиологически важном диапазоне рН (около нейтрального значения). Буферными свойствами обладают и некоторые органические вещества — аминокислоты, полипептиды, белки, так как являются амфотерными соединениями и способны реагировать как с кислотами, так и со щелочами, нейтрализуя их.

Значимость рН для жизнедеятельности микроорганизмов определяется и его влиянием на уровень другого важнейшего показателя питательной среды — окислительно-восстановительного потенциала.

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) — показатель степени окисленности или восстановленности среды устанавливается благодаря наличию в ней окислителей, восстановителей и действию свободного кислорода.

Этот показатель лежит в основе разделения микроорганизмов на две большие группы — аэробов и анаэробов.

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что зависимость процессов роста микроорганизмов от наличия свободного кислорода определяется не столько прямым его действием на микробные клетки, сколько косвенным, а именно повышением степени окисления среды (уровня ОВП).

Процессы роста и размножения микроорганизмов основаны на совокупности последовательно протекающих ферментативных реакций, для каждой из которых необходим свой уровень ОВП. Этим определяется значительная важность этого фактора в микробиологии.

Для каждого микроорганизма необходима своя зона ОВП, в которой возможен его рост, подобно тому, как есть своя оптимальная зона и рН.

Величину ОВП определяют, главным образом, электрометрически, выражают в вольтах (В) или милливольтгах (мВ) и обозначают символом Eh.

При определении ОВП необходимо учитывать, что он зависит и от рН среды — в кислой среде ОВП выше, чем в средах при нейтральном и щелочном значении рН. Из этого следует, что окислительно-восстановительное состояние сред можно характеризовать только по двум показателям — Eh и рН, которые следует определять одновременно.

В связи с этим при определении ОВП иногда используют другой символ — rH<sub>2</sub>, объединяющий величины Eh и рН, связанные следующим соотношением:

$$rH_2 = \frac{Eh}{0.029} + 2pH \cdot$$



Этот символ удобен в работе, однако использование его приносит некоторую неточность в результаты измерения.

От уровня ОВП среды зависит рост как аэробов, так и анаэробов, однако у аэробов эта зависимость менее заметна, так как на питательной среде, полностью не изолированной от воздуха (в сосудах, пробирках с ватно-марлевыми пробками, в чашках Петри), уровень этого фактора соответствует уровню, необходимому для их роста.

Ингибирование роста может наблюдать только при избыточной аэрации, а, следовательно, и при слишком высоком ОВП. Вероятность такого ингибирования особенно велика при повышенной интенсивности аэрирования солевых питательных сред, имеющих малую буферную емкость.

Облигатные анаэробы проявляют повышенную чувствительность к этому условию в среде и прекращают размножаться при Eh выше — 0,1В. Создание или поддержание Eh среды на заданном уровне представляет собой более сложную задачу, чем регуляция pH.

В случае, когда надо повысить Eh, в среду добавляют какой-либо из окислителей —  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $KMnO_4$ ,  $H_2O_2$  и др. или увеличивают поступление в нее кислорода воздуха различными способами (в зависимости от способа культивирования).

Для снижения Eh питательной среды используют многие приемы:

- загущение среды, затрудняющее диффузию кислорода воздуха в среду;
- вытеснение из среды воздуха кипячением или инертными газами — аргоном, азотом, гелием;
- добавление к среде органических и неорганических восстановителей (редуцирующих веществ). Из органических восстановителей в основном используются: цистеин, аскорбиновая кислота, тиогликолят натрия, L-тирозин, глутатион. В некоторых питательных средах для анаэробов добавляют измельченное мясо, содержащее восстановители. Из неорганических восстановителей наиболее широкое применение нашли: гидросульфит натрия ( $Na_2S_2O_4$ ), гексацианоферроат калия  $K_4[Fe(CN)_6]$ , различные сульфиды.

В зависимости от степени чувствительности анаэробной культуры к кислороду используют тот или иной прием, или несколько одновременно.

При выборе окислителей или восстановителей для регуляции Eh среды следует учитывать их возможное действие, как компонента среды, на свойства конкретной культуры микроорганизма.

## **Основные принципы изготовления питательных сред**

Для микробиологических исследований выпускают среды двух типов — готовые к употреблению и сухие среды. И те и другие среды имеют недостатки и преимущества, а в целом выгодно дополняют друг друга.

### **Готовые питательные среды**

Для получения качественных, стабильных по составу питательных сред необходимо соблюдать в процессе их изготовления определенные условия.

Среды должны изготавливаться в точном соответствии с их рецептурой (качественно-количественном составом). При этом необходимо соблюдать и последовательность внесения компонентов, указанную в инструкции по их изготовлению. Отклонение от этого правила может привести к помутнению среды, образованию осадка.

Последовательное растворение компонентов в дистиллированной или водопроводной воде проводят при нагревании и постоянном перемешивании, осуществляя визуальный контроль за полнотой их растворения. Необходимо следить за тем, чтобы продолжительность нагрева среды была бы минимальной, так как в результате длительного воздействия повышенных температур возможны деструкция и изменение свойств отдельных компонентов.

Особого внимания требует коррекция pH среды на всех стадиях ее изготовления.

Коррекцию pH следует вести осторожно с тем, чтобы не допустить существенного подкисления или перещелачивания среды, и таким образом избежать необходимости последующей дополнительной коррекции. Дополнительное внесение кислот и щелочей не только влияет на химические процессы, протекающие в среде, но и увеличивает концентрацию минеральных солей.

Кроме того, необходимо учитывать, что в процессе стерилизации сред автоклавированием этот показатель, в зависимости от состава среды, может изменяться в той или иной степени. В этом случае вводится соответствующая поправка к уровню рН, устанавливаемому в среде до стерилизации с тем, чтобы в готовой стерильной среде он соответствовал бы требуемому значению.

После стерилизации рН проверяют вновь.

Некоторые компоненты среды следует стерилизовать отдельно из-за их чувствительности к нагреванию или к действию рН при повышенной температуре. Так, например, в средах с повышенным уровнем рН (около 8,0) и содержащих глюкозу после стерилизации рН снижается до 5,0 – 6,0, при этом глюкоза карамелизуется, среда приобретает темную окраску.

Для таких сред глюкозу стерилизуют отдельно при рН 5,0 – 6,0 и вносят в стерильную среду перед посевом.

В процессе стерилизации агаризованных сред с низким рН (ниже 5,0) агар подвергается гидролизу, в результате чего утрачивает свойство образовывать плотный гель при охлаждении среды.

В подавляющем большинстве питательные среды должны быть прозрачными. С этой целью их подвергают фильтрованию. Жидкие и содержащие желатин среды (в горячем виде) фильтруют через бумажные фильтры, среды с агаром — через ватно-марлевые.

В случаях, когда после фильтрования среды остаются мутными, к среде добавляют вещества-осветители: белок куриного яйца, сыворотку крови лошади или других животных, цельную кровь, химически чистый мел, древесный уголь и др.

В лабораторных условиях изготавливать среды лучше в посуде из нержавеющей стали или нейтрального стекла (ГОСТ 19808-80). Другие типы стекла могут быть источниками микроэлементов или не выдерживать стерилизацию и др.

Для изготовления питательных сред в больших объемах желательно использовать емкости из нержавеющей стали или боросиликатного стекла. Для этих целей абсолютно непригодна медная, оловянная и оцинкованная посуда как источник ионов тяжелых металлов, обладающих ингибиторными свойствами.

Приготовленные среды разливают в чистую и сухую посуду (колбы, флаконы, пробирки, специальные планшеты и др.), которую закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют.

Однако в таком виде стерильная среда не может длительно храниться, так как быстро сохнет. Чтобы избежать высыхания среды разливают в стеклянные флаконы, герметично закрывают их резиновыми пробками, которые затем завальцовывают алюминиевыми колпачками. В таком виде среды могут храниться больше года.

Среды, разлитые в чашки Петри, также можно длительно хранить, если чашки со средой запаять в полиэтиленовые пакеты.

Готовые к употреблению питательные среды широко используются в мировой практике благодаря ряду их преимуществ перед сухими средами, а часто в силу незаменимости.

- Готовые среды могут использоваться без каких-либо предварительных манипуляций, в том числе и такой трудоемкой, как стерилизация;
- они могут иметь любую рецептуру, включая и такую, которая из-за своей сложности исключает возможность изготовления ее в виде сухой среды или замены другими сухими средами. К их числу можно отнести апробированные многими десятилетиями среды Китт-Тарощи, Блаурокка, Хейфлика и др.;
- качество готовых питательных сред подвергается контролю (биологическому и физико-химическому) и гарантируется изготовителем;
- при работе с некоторыми возбудителями инфекций, особенно требовательных к составу среды, важно, чтобы питательные компоненты среды были представлены полноценными, высококачественными продуктами; в одних случаях это парное говяжье мясо, в другом — мышца сердец, мозг, кровь и др. Поскольку готовые питательные среды изготавливают по индивидуальному заказу, вопросы об источниках питательных элементов могут быть оговорены;
- высокая потребность в готовых питательных средах обусловлена еще и тем, что перечень сухих сред, выпускаемых в нашей стране не настолько велик, чтобы удовлетворить ими потребности в различных областях микробиологии. Использование сухих сред зарубежных фирм ограничено из-за их высокой стоимости.

Готовые питательные среды в значительных количествах выпускаются соответствующими фирмами, научно-производственными объединениями и др.

### **Сухие питательные среды**

Сухие питательные среды и обезвоженные компоненты для их изготовления выпускают различные предприятия и фирмы.

Сухие среды выпускают, главным образом, в виде мелкодисперсных порошков, но могут быть представлены и в виде гранул, шариков, таблеток и в другой форме. Они хорошо растворяются в воде, не вызывая помутнения или образования осадка. Они, как правило, имеют большой срок реализации при строгом соблюдении условий хранения.

Преимуществом сухих питательных сред является простота изготовления из них сред, готовых к употреблению. С этой целью навеску среды, указанную на этикетке, вносят в соответствующий объем дистиллированной или водопроводной воды, растворяют при нагревании до кипения и далее поступают так, как при изготовлении среды из отдельных компонентов (сред, готовых к употреблению).

Одной из основных причин, по которой из сухих сред могут быть получены некачественные готовые среды, являются ошибки потребителя в процессе использования сухих сред, а именно — при взвешивании, регулировании рН, стерилизации и др.

Для получения сухих сред используют такое же сырье, как и для сред, готовых к употреблению — мясо, рыбу, молоко, пептоны, гидролизаты, кровь и др., однако в целях повышения экономичности укрупненного производства часто используют более дешевое сырье невысокого качества.

Все сухие среды гигроскопичны и требуют постоянной защиты от влажного воздуха, так как увлажнение приводит к снижению их качества, к порче.

При работе с сухими питательными средами следует учитывать, что при ингаляции их (прежде всего порошков) или при продолжительном контакте с кожей могут возникнуть аллергические реакции.

Сухие питательные среды в очень широком ассортименте выпускают многие зарубежные фирмы: Vестon Dickinson (США), «Оксид» (Великобритания), Bio-Rad (Франция), «Имуна» (Чехословакия) и многие другие. Однако при этом не исключается возможность того, что среды под одним наименованием, выпускаемые разными фирмами, дают разные результаты.

В нашей стране ассортимент сухих питательных сред не достаточно широк и в настоящее время потребность микробиологии во многих средах удовлетворяется за счет готовых к употреблению сред. В первую очередь это относится к средам сложным по составу, содержащим редкие или дорогостоящие ингредиенты и предназначенные для особо требовательных микроорганизмов, а также к средам для грибов и актиномицетов.

## **ГЛАВА 4. ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА, КОНТРОЛЬ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ИХ ХРАНЕНИЕ**

Микробиологические исследования — выделение, хранение, культивирование микроорганизмов, изучение их морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, дифференциальная диагностика и многое другое осуществляются с использованием питательных сред. Получаемые результаты и правильность выводов, сделанных на их основе, в первую очередь зависят от качества сред, стабильности их свойств. Вместе с тем, различные серии сред, приготовленных даже по одному и тому же рецепту, могут различаться по питательной ценности или другим свойствам. В связи с этим питательные среды, как производственные (коммерческие), так и лабораторного приготовления, должны подвергаться контролю по физико-химическим и биологическим показателям.

Коммерческие среды промышленного производства контролируются на предприятиях, и их качество гарантируется изготовителем. Дополнительный контроль потребителем проводится лишь в тех случаях, когда неудовлетворительные качества среды выявляются визуально (изменение цвета, помутнение или появление осадка, нестандартная плотность геля) или с помощью биотестов (позднее появление роста, низкая эффективность роста и др.).

Среды, изготавливаемые в лаборатории, перед использованием должны подвергаться внутрिलाбораторному контролю по многим показателям.

В качестве физико-химических показателей используют, главным образом, следующие:

- прозрачность и цветность;
- рН и Eh;
- содержание хлоридов (в пересчете на натрия хлорид);
- содержание аминного азота;
- стерильность.

Агаризованные среды контролируют и по таким показателям, как:

- температура плавления студня среды;
- температура застудневания среды;
- плотность студня среды.

**Прозрачность и цветность среды** являются важными характеристиками среды, так как в значительной степени определяют достоверность визуальных наблюдений за ее стерильностью, за наличием или отсутствием роста микрофлоры исследуемых биосубстратов.

рН — условие среды, оказывающее существенное влияние как непосредственно на микроорганизмы, так и на уровень окислительно-восстановительного потенциала в среде. Поддерживать определенный уровень рН особенно важно при культивировании патогенных микроорганизмов, которые приспособились к существованию в организме человека и жизнедеятельность которых возможна в определенном, достаточно узком диапазоне этого фактора. Большинство микроорганизмов, в том числе и патогенных, особенно активно растут при нейтральном и слабощелочном значении рН.

Уровень рН питательной среды измеряется потенциометрически, агаризованные среды предварительно расплавляют и охлаждают до 40 – 45°C.

**Eh (окислительно-восстановительный потенциал, ОВП)** характеризует уровень окислительно-восстановительного состояния питательных сред и создается благодаря наличию в них обратимых и необратимых окислительно-восстановительных пар, разнообразных растворенных окисленных и восстановленных компонентов, действию кислорода воздуха.

Измерение ОВП проводят потенциометрически. Как и в случае с измерением рН, агаризованные среды предварительно расплавляют и охлаждают до 40 – 45°C.

**Содержание хлоридов** (в пересчете на натрия хлорид) является относительным показателем уровня осмотического давления в среде, соответствия его уровню, необходимому для сохранения жизнедеятельности микроорганизмов.

Определение хлоридов в питательной среде предпочтительнее проводить методом Фольгарда, чем методом Мора, имеющего ряд ограничений по использованию (отсутствие в среде фосфатов, карбонатов, белков).

**Содержание аминного азота** является одним из основных показателей сред, так как именно в этой химической форме азот наиболее легко усваивается большинством микроорганизмов. Определение аминного азота проводят методом рН-метрического формольного титрования. Метод основан на связывании формальдегидом при рН 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

**Стерильность** — обязательный показатель, так как использованию подлежат только стерильные питательные среды, не содержащие посторонней микрофлоры.

Определение проводят визуально, просматривая 10% от партии среды после выдерживания их в течение 48 часов при температуре от 36 до 38°C и последующих 12 суток при температуре 20 – 25°C.

Температура плавления плотной агаризованной среды не должна быть ниже 80°C, а температура застудневания — не ниже 30°C и не выше 37°C. Эти свойства агаризованных сред позволяют использовать их для культивирования микроорганизмов, растущих при сравнительно высоких температурах — от 36 до 40°C.

**Прочность студня среды.** Для культивирования микроорганизмов на поверхности агаризованных сред с целью изоляции, хранения, изучения морфолого-культуральных признаков используют среды с определенной прочностью студня.

При недостаточной, низкой прочности студня среды проявляют свойство «текучести», что не позволяет производить посе́вы петлей или шпателем, а иногда делает невозможным и сам процесс культивирования.

В случае повышенной прочности студня массообменные процессы между микробными клетками и средой затрудняются, в результате чего снижается ее питательная ценность для микроорганизмов.

Как показал опыт, наиболее предпочтительной прочностью студня среды для поверхностного культивирования микроорганизмов является  $(350 \pm 35)$  г.

**Биологический контроль** качества питательных сред проводится по следующим основным показателям:

- чувствительность;
- стабильность основных свойств микроорганизмов;
- дифференцирующие свойства;
- скорость роста;
- ингибирующее свойство.

Следует отметить, что перечень биологических показателей, как и физико-химических, может пополняться или наоборот, сокращаться в зависимости от состава среды, ее назначения, цели использования.

Так, например, для оценки качества транспортных сред (среды Эймса и Кери-Блейра) используют такие биологические показатели, как сохранение жизнеспособности и биологических свойств тест-штаммов, отсутствие их размножения, а из числа физико-химических исключают такой показатель, как содержание аминного азота.

Биологический контроль питательных сред проводится с использованием соответствующих типовых тест-культур микроорганизмов.

При выборе контрольных штаммов исходят, прежде всего, из назначения среды, а именно — для культивирования (хранения, выделения и др.) каких микроорганизмов она предназначена. Кроме того, тест культуры должны отличаться хорошо выраженными стабильными при пересевах морфолого-культуральными и биохимическими признаками, входить в состав известных коллекций типовых культур.

Тест-штаммы хранят в лиофилизированном состоянии или на соответствующих средах хранения.

Перед использованием тест-штаммов для контроля их пересевают на питательный агар (например СПА или ГРМ-агар) или питательный бульон (например, ГРМ-бульон) не более 2 раз, проверяют на чистоту и отсутствие диссоциации по определенным тестам. Затем из культур, полученных при втором пересеве, готовят стандартные взвеси каждого тест-штамма, соответствующие 10 единицам по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85.

Стандартные взвеси десятикратно разводят 0,85%-ным раствором натрия хлорида до нужной концентрации —  $(10^{-1} - 10^{-8})$  и используют для контроля.

**Чувствительность** питательной среды определяют либо по минимальному количеству колониеобразующих единиц (КОЕ), при котором появляется рост колоний, либо по максимальному десятикратному разведению культуры из исходной взвеси (стандартизованной до 10 ед.), при котором наблюдается рост на среде во всех засеянных чашках Петри.

**Стабильность основных свойств микроорганизмов** определяют по уровню сохранения у тест-штаммов характерных тинкториальных, морфолого-культуральных, физиологических и др. признаков на испытываемой среде.

При росте на агаризованных средах контролируемыми признаками тест-культур являются: размер, форма, консистенция, характер поверхности, окраска колоний; при росте в полужидких — равномерное или зональное помутнение среды, формирование «роев» и др.; при росте в жидких средах — равномерное помутнение среды, образование поверхностной пленки, придонный или пристеночный рост, образование осадка и др.

Стабильность основных морфологических признаков на контролируемой среде оценивают, определяя форму, размер, взаимное расположение микробных клеток, наличие у них спор, капсул, жгутиков.

**Дифференцирующие свойства** определяют, главным образом, у дифференциально-диагностических сред и оценивают по тому, насколько четко на них проявляются типичные и

наиболее характерные признаки определенного вида микроорганизмов, что, в свою очередь, определяет возможность отличать одни виды от других.

Дифференцирующие свойства сред определяют и с использованием ассоциаций культур, включающих исследуемые и какие-либо другие виды микроорганизмов.

По четкости отличий колоний (культуральных признаков) исследуемых видов микроорганизмов от колоний ассоциантов, выросших на контролируемой среде, определяют и уровень специфичности ее дифференцирующих свойств.

Среды, обладающие дифференцирующими свойствами, издавна и широко используются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации отдельных групп микроорганизмов. Так, например, на известной среде Эндо легко идентифицировать бактерии из рода *Escherichia*, так как они, в отличие от других бактерий, на этой среде образуют ярко-малиновые колонии с металлическим блеском.

**Скорость роста** микроорганизмов в значительной степени зависит от питательной ценности среды, ее доброкачественности — на качественной среде она выше, чем на менее качественной.

Скорость микробного роста определяют по минимальному времени (час) инкубации посева, по истечении которого появляется видимый невооруженным глазом рост культур во всех засеянных пробирках с жидкими или полужидкими средами или формируются типичные колонии на агаризованных средах в чашках Петри.

Наблюдения за ростом микроорганизмов на плотных и полужидких питательных средах проводят через 12, 18, 24, 48 часов инкубации, а на жидких несколько раньше — через 3 – 6, 12 ч и далее.

**Ингибирующее действие питательных сред** определяют как степень подавления посторонней микрофлоры и выражают величиной отношения среднего количества колоний, образовавшихся на исследуемой («ингибиторной») среде, к среднему количеству колоний, выросших на контрольной среде — среде выращивания, либо к расчетному количеству посеянных бактерий.

Показатель ингибиции можно оценивать и по величине посевной дозы КОЕ (количество колониеобразующих единиц), рост которых полностью подавляется на испытуемой среде при одновременном наличии роста на среде выращивания.

При биологическом контроле питательных сред часто определяют и **воспроизводимость** их показателей. Воспроизводимость оценивают по частоте совпадения результатов при повторных испытаниях сред с теми же тест-штаммами и в тех же условиях и выражают в %.

В качестве альтернативного метода биологического контроля питательных сред в практике иногда применяют метод, основанный на использовании в качестве контрольных сред среды с известными положительными свойствами (высококачественные среды) и ранее применяемые, апробированные в лаборатории. Сравнительный анализ показателей испытуемой среды с аналогичными показателями контрольной, как правило, бывает полезен при оценке пригодности для использования испытуемой среды.

## **Условия и сроки хранения питательных сред**

Возможность длительного хранения питательных сред при одновременном сохранении комплекса свойств, позволяющих использовать их по назначению, зависит от многих факторов. К ним, в частности, относятся тип среды, технология и условия приготовления, качество исходных компонентов, способ стерилизации, вид и качество посуды, способ фасовки, условия хранения.

Из вышеуказанных факторов наименее изученными являются условия и сроки хранения сред. Вопросам хранения питательных сред и, прежде всего, сред лабораторного изготовления до настоящего времени уделяется неоправданно мало внимания. Тем не менее, имеющаяся научная информация и большой опыт практической работы с питательными средами позволили исследователям сформулировать ряд рекомендаций, которых следует придерживаться при решении этих вопросов.

## **Условия и сроки хранения лабораторных сред**

Стерильные лабораторные среды не рекомендуется долго хранить, так как при этом они подвергаются высыханию. И это, прежде всего, относится к средам, расфасованным в пробирки,

колбы и другие сосуды, закрытые ватно-марлевыми пробками, в чашки Петри. При высыхании среды становятся более концентрированными, а, следовательно, изменяются их состав и свойства. Кроме того, на поверхности агаризованных сред в пробирках, чашках Петри возникает недостаток влаги, который обычно устраняют повторным нагреванием среды. Однако этот прием может оказать негативное действие на свойства среды и, к тому же, возможен лишь в том случае, если среда не содержит термолабильных компонентов.

При хранении жидких питательных сред в них не только повышается концентрация компонентов из-за высыхания, но и снижается рН в результате поглощения средой из воздуха диоксида углерода. В силу этого жидкие среды перед посевом иногда нагревают на водяной бане или текучим паров в течение нескольких минут для удаления растворенных газов. Такой процедуре подвергают и среды, предназначенные для культивирования анаэробных микроорганизмов с целью удаления растворенного в них кислорода воздуха.

Кроме вышеуказанных факторов, снижающих качество готовых питательных сред при длительном их хранении, негативное действие могут оказывать и химические реакции, постоянно протекающие в среде.

Максимальный срок хранения готовых сред зависит от типа сред, лабораторной посуды, в которую они разлиты, от способа их укупорки.

Важными условиями, которые необходимо соблюдать при хранении сред, являются температуры, отсутствие света и повышенной влажности.

подавляющее большинство питательных сред хранят при температуре от 2 до 25°C. Некоторые среды, в том числе содержащие кровь, антибиотики, витамины и другие органические добавки, хранят в холодильнике при температуре не выше 4 – 6°C.

Так как многие красители, индикаторы и факторы роста светочувствительны, среды, как правило, хранят в защищенном от света месте. Повышенная влажность обуславливает возможность инфицирования сред мицелиальными грибами, которые быстро развиваются на увлажненных ватных пробках и через них проникают в сосуд со средой.

## **Условия и сроки хранения сухих питательных сред**

Хранение сухих питательных сред отличается простотой, при этом хранятся они могут длительное время.

Основными условиями хранения, так же как и для других сред, являются температура, отсутствие света и влажности.

Многие из сухих сред рекомендуется хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте и при пониженной влажности воздуха. Избегать влажности особенно важно для сред, представляющих собой гигроскопичные порошки. Увлажнение приводит к изменению их внешнего вида (более темная окраска, комкование, «сплавление» и т.д.) и свойств, а часто и к порче.

Продолжительность сохранения сухих питательных свойств без снижения качества зависит от их состава, качества исходных компонентов, технологии изготовления, фирмы-изготовителя и др.

Так сухие среды фирмы Oxoid, за некоторым исключением, при надлежащем способе хранения, имеют срок годности 5 лет; порошковидные среды фирмы Merck (ФРГ) — 1 год, а в виде гранул — 3 года.

Сухие питательные среды фирмы Sevac (Чехословакия) рекомендуется хранить в сухом темном месте в течение 3 лет.

На упаковке сред имеется маркировка, в которой кроме вида среды, состава, рН, условий стерилизации, даты изготовления, указывается и срок ее хранения.

Среды, хранящиеся более указанного срока, перед использованием необходимо контролировать по физико-химическим и биологическим признакам.

## **ГЛАВА 5. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

В микробиологии используют, как правило, только стерильные питательные среды.

В настоящее время известно много способов их стерилизации, которые разделяют на две основные группы: термическую и холодную стерилизацию.

Из термических способов наиболее широко используются стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), стерилизация текучим паром, тиндализация и кипячение.

**Стерилизация насыщенным паром под давлением** — один из наиболее эффективных методов, основанный на прогревании субстрата насыщенным паром в автоклавах — аппаратах, работающих под давлением выше атмосферного, так как с повышением давления пара повышается и его температура (табл.3).

Таблица 3

#### Температура насыщенного пара при различных давлениях

Избыточное давление, атм	Температура, °С
0,5	112
0,6	114
0,7	116
0,8	117
1,0	121
1,5	127
2,0	134

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает надежность стерилизации: при автоклавировании погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Среды, предназначенные для стерилизации в автоклаве, наливают не выше половины высоты сосуда, сосуд закрывают ватно-марлевой пробкой или резиновой пробкой, которую завальцовывают.

Температура и длительность автоклавирования определяются прежде всего составом питательной среды. Обычно стерилизация проводится при температуре 121°С в течение 15 минут. Тем не менее необходимо помнить, что такая стерилизация не всегда является безвредной для питательной среды: длительное автоклавирование при повышенном давлении часто приводит к гидролизу в ее составе некоторых питательных компонентов.

Питательные среды, в составе которых имеются термолабильные вещества, стерилизуют при более низких температурах и давлении — 112°С (т.е. 0,5 атм) в течение 15 мин. При таком режиме стерилизуют, например, среды, содержащие углеводы, пивное сусло, некоторые витамины, молоко, желатин.

При выборе режима стерилизации необходимо учитывать не только состав среды, но и уровень ее кислотности или щелочности — рН. В случае кислой реакции или повышенной щелочности могут подвергаться гидролизу полимерные компоненты среды. Так, при стерилизации в автоклаве среды, содержащей желатин, при рН ниже 6,0 происходит пептонизация желатина, в результате чего среда не затвердевает даже при охлаждении. При рН ниже 5,0 частично гидролизуются и агар-агар, утрачивая свойство образовывать плотный гель. В процессе стерилизации среды, имеющей щелочную реакцию, карамелизуются углеводы, выпадают в осадок соли некоторых металлов.

Чтобы избежать подобных явлений, желательно стерилизовать среды при нейтральном значении рН, а после автоклавирования подкислить или подщелочить их с помощью стерильных растворов кислот или щелочей соответственно. Кроме того, некоторые компоненты среды стерилизуют при таком значении рН и таком режиме, при которых они практически не изменяются, а затем их добавляют стерильно в среды в нужном количестве.

На всех этапах процесса стерилизации необходимо вести контроль за режимом по таким критериям, как давление и температура. Для наблюдения за давлением в автоклаве пользуются манометрами, которые периодически проходят поверку.

Для контроля за температурой пользуются химическими термотестами, которые представляют собой вещества, изменяющие свой цвет и(или) физическое состояние после воздействия определенной температуры. Запаянные ампулы с порошком, смешанным с краской,



или вещества, плавящиеся только при определенной температуре, помещают в стерилизационную камеру вместе с питательными средами, подлежащими стерилизации. При достижении в камере определенной температуры порошок плавится, образуя сплав, окрашенный в цвет добавленной краски, или плавящиеся вещества приобретают иное состояние — из кристаллического, переходят в аморфное со спонтанным изменением окраски, или только плавятся (табл.4).

Таблица 4

Наименование	Температурный параметр, подлежащий контролю, °С	Цвет расплавленного индикаторного вещества
Резорцин, фуксин кислый	110 + 2	Фиолетовый или темно-красный
Бензойная кислота, Фуксин кислый	120 + 2	Фиолетовый или темно-красный
Бензамид, фуксин кислый	124 + 3	Фиолетовый
Сукцинамид, фуксин кислый	124 + 2	Фиолетовый или темно-вишневый
Никотинамид, фуксин кислый	132 + 2	Фиолетовый или темно-вишневый
Мочевина, фуксин кислый	132 + 2	Фиолетовый или темно-вишневый
Левомицетин, фуксин кислый	160 + 2 – 10	Темно-красный или фиолетовый
Лактоза, фуксин кислый	170 + 3	Темно-коричневый или темно-фиолетовый
Тиомочевина	180 + 2 – 10	Желтый или желто-зеленый
Гидрохинон	180 + 2 – 10	Серый с фиолетовым оттенком
Кислота винная	180 + 2 – 10	Светло-коричневый или коричневый

Более надежным методом контроля эффективности стерилизации является применение биоиндикаторов. Для проведения такого контроля в стерилизационную камеру, одновременно со средами, подлежащими стерилизации, помещают биотесты — пробирки с полосками марли или фильтровальной бумаги, зараженные микроорганизмами с известной устойчивостью к температурным воздействиям. Обычно для этой цели используют бактерии рода *Bacillus* — *B. subtilis* или *B. stearothermophilus*. После окончания стерилизации биотесты направляют в лабораторию, где пробирку с биотестом заливают сахарным бульоном и посеvy инкубируют 48 ч при 37°С. При наличии визуального роста готовят мазки для идентификации культуры.

Для контроля стерильности питательные среды после стерилизации помещают в термостат при 37°С на 5 сут. Жидкие среды должны оставаться прозрачными, а на поверхности и в толще агаризованных сред не должны появляться признаки роста. Кроме контроля стерильности, производят химический контроль готовых сред, для чего в нескольких образцах каждой серии определяют рН, количество общего и аминного азота, хлоридов и др.

Кроме того, каждая среда должна пройти биологический контроль. Для этого несколько образцов среды засевают лабораторной культурой того микроорганизма, для которого приготовлена среда, и изучают характер его роста. Только после всех видов контроля среды можно использовать по назначению.

**Стерилизация текучим паром** применяется для стерилизации сред, содержащих вещества, разлагающихся при температуре выше 100°C (аммиачные соли, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Стерилизацию проводят в автоклаве при открытом спускном кране и незавинченной крышке или в аппарате Коха. Флаконы или колбы со средой загружают в камеру неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта их с паром. Началом стерилизации считается время с момента закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру. Обработку питательных сред текучим паром проводят по 15 – 30 минут ежедневно в течение 3 дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микроорганизмов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре. Последующая стерилизация достаточно надежно обеспечивает стерильность среды.

**Тиндализация** — дробная стерилизация с применением температуры ниже 100°C, предложенная Тиндалем. Тиндализация применяется для стерилизации питательных сред, имеющих в своем составе вещества, легко разрушающиеся при высокой температуре (сыворотки, витамины).

Прогревание стерилизуемой питательной среды производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу, при температуре 60 – 65°C в течение 5 дней или при 70 – 80°C в течение 3 дней.

В промежутках между прогреваниями среды выдерживают при температуре 25 – 37°C для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях.

Следует учитывать, что эффективность тиндализации, как и в ряде случаев стерилизации текучим паром, зависит от того, прорастают ли споры. Поэтому она не достигает цели, если споры находятся в среде, непригодной для роста или содержащей ингибиторы, или если среда в промежутках между нагревами инкубируется при температуре, неблагоприятной для прорастания спор.

**Холодная стерилизация.** Основными способами холодной стерилизации являются различные типы фильтрования и облучения. Такой стерилизации подвергают растворы веществ, которые при нагревании разрушаются или существенно изменяют свои свойства. К ним относятся многие витамины, антибиотики, ферменты, сыворотки, лекарственные препараты и др.

#### **Стерилизация фильтрованием**

Для стерилизации фильтрованием используют фильтры, изготавливаемые из материалов с различными физико-химическими свойствами, пропускной и адсорбционной способностями.

В микробиологической практике наиболее широко применяются фильтры мембранные, асбестовые (фильтры Зейца), фарфоровые (фильтры-свечи) и стеклянные различных конструкций.

Область применения фильтров определяется, главным образом, диаметром их пор. О пригодности фильтра для стерилизации судят не только по имеющемуся на нем индексу, но и путем предварительной (контрольной) фильтрации через него суспензии относительно небольших бактерий, например, *P.aeruginosa*, *P.diminuta*, *S. marcescens*.

**Мембранные фильтры** представляют собой диски различного диаметра и толщиной 0,1 – 0,5 мм, изготавливаемые из ацетата целлюлозы и нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы, полиамида и различающиеся по диаметру пор.

Для стерилизации могут использоваться отечественные фильтры марок МФА-МА. МФА-А с размерами пор от 0,20 до 0,45 мкм. Известная фирма «Миллипор» (Франция) выпускает фильтры с диаметром пор от 0,01 до 14,0 мкм; фирма «Синпор» (Чехословакия) — от 0,02 до 1,0 мкм.

Мембранные фильтры с диаметром пор 0,1 мкм и меньше называются ультрафильтрами и используются для выделения вирусов и высокомолекулярных белков.

К достоинствам мембранных фильтров относится сравнительно высокая скорость фильтрования и малая адсорбционная способность (способность задерживать кроме клеток различные вещества), а основным недостатком — непригодность для длительного фильтрования, т.к. сравнительно быстро закупориваются поры. Так, при диаметре фильтра 35 мм возможно простерилизовать в среднем 10 мл раствора. Мембранные фильтры используют однократно.

**Асбестовые фильтры** известны под названием фильтров Зейца. Их изготавливают из смеси асбеста с целлюлозой в виде плотных пластинок различной толщины (от 4 до 6 мм) и диаметра (от 35 до 140 мм). Размер пор от 0,8 до 1,8 мкм.

Плотность фильтров обозначается индексами, указанными на фильтрах (табл.5).

### Асбестовые фильтры

Индекс фильтра	Диаметр пор, мкм
ЕК	1,5 – 1,8
ЕКС	1,2 – 1,5
ЕКС-1	1,0 – 1,2
ЕКП	0,8 – 1,0

Асбестовые фильтры дешевы, доступны, характеризуются высокой емкостью поглощения. Однако следует учитывать, что в процессе фильтрования из этих фильтров в фильтрат могут выделяться щелочи, соли щелочных металлов, а иногда и соли железа, они способны адсорбировать различные вещества из фильтруемой жидкости.

Асбестовые фильтры, как и мембранные, используются однократно.

**Стеклянные фильтры** представляют собой двуслойные диски из мелкопористого стекла, впаянные в стеклянные воронки-держатели разной формы. Особенно широко известны фильтры Нутча и Бюхнера.

Наибольший размер пор у стеклянных фильтров — 200 – 400 мкм, наименьший — 1 – 1,5 мкм. Для стерилизации используются фильтры с диаметром пор, не превышающим 1 – 1,5 мкм.

В отличие от асбестовых, они обладают меньшей адсорбционной способностью, не загрязняют фильтрат.

Из-за нестандартности размеров пор фильтры из стекла перед употреблением должны быть проверены на стерилизующий эффект, а перед повторным использованием необходима их специальная и весьма длительная обработка.

**Фарфоровые фильтры**, известные как свечи Шамберлана, Беркефельда, изготавливают из фарфора, кремнезема, каолина с примесью песка и с порами разного размера, и обозначаемые марками L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> .....L<sub>13</sub> (чем крупнее поры, тем меньше индекс). Для бактериологических целей, как правило, используют свечи марок L<sub>5</sub>-L<sub>7</sub>.

Основные недостатки свечей — непрочность, низкая скорость фильтрации, быстрая закупорка пор и сложность (или невозможность) регенерации. К тому же механизмом их фильтрующего действия является адсорбция.

Стерилизацию питательных сред или растворов отдельных их компонентов проводят под вакуумом, который создают вакуумным или водоструйным насосом.

#### Стерилизация облучением

Летальное действие на клетки микроорганизмов оказывают многие виды излучений — ультрафиолетовое, рентгеновские лучи, α-, β- и γ- лучи радиоактивных элементов и другие.

Чувствительность микроорганизмов к облучению зависит от очень многих факторов — источника излучений, времени экспозиции, вида микроорганизма, его концентрации и физиологического состояния, состава среды, в которой он находится, и многое другое.

В целях стерилизации используют УФ-облучение с длиной волны 254 нм, однако, его применение ограничено из-за малой проникающей способности. От УФ-лучей микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью, стеклом или другим покрытием, в то время как воздействие на микробные клетки должно быть непосредственным и продолжительным. В силу этого ультрафиолетовые лучи применяют для облучения биологических жидкостей в тонком слое, например, крови, плазмы, вакцин для уничтожения вирусов, но, главным образом, для стерилизации воздуха закрытых помещений, поверхностей, лабораторного оборудования, потолков, стен и полов.

Высокой проникающей способностью и мощностью обладают гамма-лучи, обеспечивающие стерилизующее действие в короткий промежуток времени. Эти лучи проникают через бумагу, дерево, стекло, ряд металлов и другие материалы, вызывая гибель микроорганизмов. Они могут быть использованы для стерилизации жидких и плотных питательных сред, различных биологических жидкостей и растворов. Однако, в связи со специфическими требованиями по

технике безопасности работы с источниками этих излучений, а также высокой стоимостью, они используются в практике работы только крупных предприятий.

## ГЛАВА 6. БАЗОВЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ (питательные среды общего назначения)

К базовым питательным средам (или средам общего назначения) относятся многие обогащенные и сложные по составу среды, поддерживающие рост микроорганизмов различных систематических групп. Они широко используются почти во всех областях микробиологии (медицинской, почвенной, промышленной, водной и т.д.) для выделения, культивирования, хранения и идентификации микроорганизмов.

Основными питательными компонентами этих сред являются различные продукты, получаемые из мяса крупного и мелкого рогатого скота, казеина, растительных белков.

Наиболее широко используются среды, изготавливаемые на основе мясной воды — мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА) и их различные модификации. Источником азота в этих средах служат органические соединения мясной воды, продукты расщепления белков — пептоны, смесь полипептидов, аминокислот.

Мясо-пептонный агар принадлежит к числу наиболее применяемых и длительно используемых питательных сред при работе с микроорганизмами. Эта среда известна более 80 лет и до сих пор остается базовой средой, используемой в клинической микробиологии (причем в разных странах мира) с целью посева, культивирования и последующей идентификации таких микроорганизмов как стафилококки, цепочковые кокки (при условии добавления в среды сыворотки или крови), вся группа кишечных бактерий, палочка сине-зеленого гноя. В англоязычных странах среда известна как Beef EXTRACT AGAR. Среда имеет следующий состав:

Мясная вода	до 1000,0 мл
Пептон ферментативный	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар-агар	15,0 – 20,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

Мясо-пептонный агар содержит (в %, масс): общий азот — не менее 0,4, аминный азот — не менее 0,07, сухой остаток — 4,6, золу — 1,4.

В то же время существуют различные композиции, включающие в МПА в различных концентрациях кровь, сыворотку крови, яичный желток, селективные факторы, глюкозу, реже другие сахара, что позволяет применять МПА для культивирования различных микроорганизмов (в том числе патогенных), плохо растущих или совсем не растущих на обычных средах.

Основа этой среды, включающая мясную воду, пептон и хлорид натрия используется в качестве самостоятельной среды — мясо-пептонного бульона (МПБ), имеющего такое же широкое применение в микробиологии.

Мясная вода	до 1000,0 мл
Пептон ферментативный	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

В мясо-пептонном бульоне содержится (в %, масс): общий азот — не менее 0,4, аминный азот аминокислот и низших пептидов — не менее 0,09, пептоны — не менее 2,7, сухое вещество — 3,0 – 3,4, белки — не более 0,5.

В отечественной практике в качестве аналогов сред МПА и МПБ нашли применение сухие питательные среды: сухой питательный агар (СПА) и ГРМ-агар, получаемые с использованием гидролизата кильки (в случае СПА) или гидролизата рыбной муки (в случае ГРМ-агара).

Вместе с тем, вся технология приготовления «классического» МПА основана на использовании мяса продукта крупного рогатого скота, поэтому СПА и ГРМ-агар, строго говоря, не являются МПА в классическом понимании — это его более или менее удачные заменители. Однако, очевидно, что с экономической точки зрения питательные среды на основе ГРМ и гидролизата кильки имеют несомненное преимущество. Поэтому «мясной» и «рыбный» варианты МПА не противоречат, а удачно дополняют друг друга.

Многие общеупотребительные питательные среды готовятся на основе **ферментативных гидролизатов мяса**. Гидролизаты, полученные с помощью пепсина, относятся к пептонам. Так, хорошо известен пептон по Рамону, для приготовления которого используют вареное измельченное мясо (отход при производстве мясной воды) и свиные желудки.

Другим известным пептическим переваром является пептон Мартена, получаемый при гидролизе свиных желудков в кислых условиях и применяемый для культивирования самых различных микроорганизмов (в том числе патогенных). На его основе готовят бульон и агар Мартена, имеющие следующий состав:

Пептон Мартена	500,0 мл
Мясная вода	500,0 мл
Натрия хлорид	5,0 г
Натрий уксуснокислый	5,0 г
pH 8,0 – 8,2	

При добавлении в бульон Мартена агара в количестве 25 г на литр, получается агар Мартена.

**Панкреатические гидролизаты мяса по Хоттингеру** встречаются также под названиями панкреатический перевар мяса, триптический перевар мяса, триптон и используются для приготовления бульона и агара Хоттингера. По сравнению с мясо-пептонным бульоном, в который вводят обычно нестандартный компонент пептон, состав гидролизата мяса более постоянен, а по содержанию пептонов более однороден. Бульон Хоттингера имеет следующий состав.

Гидролизат мяса, разведенный дистиллированной водой до 1 литра	
с содержанием общего азота	250 – 300 мг%
и аминного азота	30 – 130 мг%.
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия дигидрофосфат	0,3 г
pH 7,4 – 7,6	

Для приготовления агара Хоттингера к смеси компонентов для получения бульона Хоттингера добавляют агар-агар в количестве 1,5 – 2,0%, pH 7,4 – 7,6.

Ферментативный гидролизат мяса выпускают в сухом виде. Энзиматический перевар мяса (перевар Хоттингера) встречается в каталогах фирм под названием Myosate, Proteosopeptone и др., а панкреатический гидролизат, полученный из мышц сердца, под названием bio-Myotone и др.

Кроме мяса и его производных в производстве питательных сред широко используется казеин и продукты его гидролиза (как ферментативного, так и кислотного), которые являются одним из полноценных видов сырья и содержат все основные аминокислоты и витамины, в том числе и те, которые отсутствуют в мясе и продуктах его переработки.

Так, из панкреатического гидролизата казеина готовят казеиновый бульон и агар с глюкозой, имеющий следующий состав (дано на литр):

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Дрожжевой экстракт	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
pH 7,2 – 7,4	

Содержание в бульоне аминного азота — 80 – 100 мг%, хлоридов — 0,5 – 0,6%.

Казеиновый агар имеет такой же состав, как и бульон, но содержит 1 – 2% агара.

В качестве основ для приготовления питательных сред используют **растительные виды сырья**. Особенно широкое применение для приготовления питательных сред за рубежом получили среды, приготовленные на основе продуктов гидролиза сои, поскольку при гидролизе сои образуются аминокислоты, сходные по составу с аминокислотами животных белков.

Так, для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (а также некоторых грибов) в мировой практике широко используется **триптиказо-соевый бульон**, имеющий следующий состав (дано на литр).

Панкреатический перевар казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат соевой муки	3,0 г

Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
pH 7,3 ± 0,2	

Кроме классического варианта триптиказо-соевого бульона существует множество его модификаций. Например, **триптиказо-соевый бульон с лошадиной сывороткой** в количестве 100 мл на литр.

**Триптиказо-соевый бульон с кровью человека** в количестве 5,0 мл на литр среды.

Для культивирования и хранения *Bacillus megaterium* используется триптиказо-соевый бульон с неомицином (дано на литр).

Панкреатический перевар казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат соевой муки	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Агар-агар	1,0 г
Раствор неомицина	10,0 мл
pH 7,3 ± 0,2	

Раствор неомицина (на 10,0 мл):

Неомицин	5,0 мг
----------	--------

В клинической практике триптиказо-соевый бульон рекомендован некоторыми авторами для выделения микроорганизмов из крови. В этом случае перед стерилизацией бульона в него добавляют антикоагулянт — натрия цитрат.

**Триптиказо-соевый агар**, содержащий 2 вида пептона, обеспечивает рост широкого круга микроорганизмов — аэробов и анаэробов (последних в случае инкубации в анаэробных условиях). Состав среды (на литр).

Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Гидролизат соевой муки	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

Эта среда может быть также использована как основа для агара с кровью (с добавлением 7% стерильной крови) и «шоколадного» агара. Существует большое число вариантов этой среды с добавлением углеводов, крови, сыворотки, селективных веществ.

## ГЛАВА 7. ТРАНСПОРТНЫЕ СРЕДЫ

Сохранение жизнеспособности микроорганизмов в период от момента взятия биоматериала до посева является важной и, зачастую, сложной задачей. Проблема является актуальной для всех микробиологических служб мира и отечественная не является исключением, поскольку в большинстве случаев время от момента взятия материала до начала исследования лимитировано. Так, по требованиям Американской ассоциации микробиологов, образцы для исследования должны быть переданы на посев не позднее, чем через 2 часа после забора. Если посев невозможен, то срок транспортировки и хранения в зависимости от вида материала и вероятного микроба при соблюдении определенных условий могут быть увеличены, но не более, чем до суток. Одним из приемов, содействующих сохранению микрофлоры, причем не только при отсрочке посева, но и сразу же при взятии биоматериала, является применение специальных **транспортных систем, содержащих транспортные питательные среды**.

Использование для транспортировки многих образцов биоматериала (гноя, кишечное содержимое и т.п.) обычных питательных сред является, зачастую, серьезной ошибкой, поскольку в них идет быстрое размножение менее требовательных сапрофитных микроорганизмов. Физиологический раствор, который часто применяют для этой цели, не обеспечивает поддержания

стабильных уровней редокс–потенциала и рН, а это, в свою очередь, существенно ограничивает жизнеспособность многих патогенных бактерий.

В настоящее время в клинике в качестве транспортных сред (консервантов) используются различные по составу композиции с разной степенью питательной ценности. Использование той или иной из них определяется соответствующими инструкциями, методическими рекомендациями и указаниями, в том числе утвержденными Минздравом РФ.

Это могут быть буферные растворы, содержащие только минеральные соли — изотонический раствор хлорида натрия или фосфатно-буферный раствор, а также консерванты, содержащие органические вещества — буферно-глицериновый солевой раствор, глицериновый консервант, 0,15%-ная пептонная вода, буферно-казеиново-дрожжевая среда.

Состав этих композиций следующий:

#### ***Фосфатно-буферный раствор***

Калия дигидрофосфат	0,45 г
Динатрия гидрофосфат	5,34 г
Вода дистиллированная	1000 мл

#### ***Буферный глицерино-солевой раствор***

Натрия хлорид	4,2 г
Дикалия гидрофосфат	3,1 г
Калия дигидрофосфат	1,0 г
Глицерин нейтральный	300 мл
Вода дистиллированная	700 мл

#### ***Глицериновый консервант***

Натрия хлорид 0,85% раствор	1000 мл
Глицерин нейтральный	500 мл
Динатрия гидрофосфат 20% раствор	150 мл

#### ***0,1% пептонная вода***

Вода дистиллированная	100 мл
Пептон бактериологический	0,1 г
Натрия хлорид	0,5 г
Калия нитрат	0,1 г
Натрия бикарбонат	0,2 г

#### ***Буферно-казеиново-дрожжевая среда***

Гидролизат казеина	2,0 г
Экстракт пекарских дрожжей	5,0 мл
Фосфатно-буферный раствор	до 1000 мл

Так для транспортировки энтеробактерий в качестве консервантов рекомендуется использовать физиологический раствор, глицериновый и фосфатно-буферный растворы. Инструкция по лабораторной диагностике кампилобактериоза предусматривает использование для этих целей, кроме физиологического раствора, 0,1%-ную пептонную воду (от 3 до 48 ч.) или тиогликолевую среду для контроля стерильности (до 3 суток).

Следует отметить, что охлаждение до 4°C позволяет значительно удлинить сроки транспортировки образцов на этих средах: в физиологическом растворе — до 24 часов, в 0,1% пептонной воде — до 72 часов и на тиогликолевой среде для контроля стерильности — до 5 – 7 суток. При исследовании материала на наличие иерсиний глицериновые консерванты не пригодны. В этом случае исследуемый материал хранят при 4 – 8°C 7 – 15 дней в фосфатно-буферном растворе или буферно-казеиново-дрожжевой среде.

Известно несколько десятков сред, которые потенциально могут быть использованы как транспортные. Однако большинство из них не отвечают одному из двух обязательных требований, которые и определяют пригодность среды именно как транспортной. **Транспортная среда, с одной стороны, должна обеспечивать сохранение жизнеспособности микроорганизма,**

причем не менее 8 – 12 часов при комнатной температуре, и, в то же время, обязана предупредить или в значительной степени лимитировать размножение микроорганизмов.

Последнее особенно важно. Необходимо сохранить жизнеспособность той части патогенной микрофлоры, которая вне хозяина быстро гибнет, особенно при условии конкурентного роста менее требовательных микроорганизмов. Как уже отмечено, эта ситуация встречается очень часто, если исследуется раневое отделяемое, кишечное содержимое, мокрота, мазки из зева и некоторые другие биосубстраты. Obligатно анаэробные бактерии, пневмококки, гемофильные бактерии, нейссерии и многие другие микроорганизмы трудно выделить из биоматериала, если параллельно идет процесс интенсивного размножения сапрофитных бактерий или более жизнестойких болезнетворных микроорганизмов. Кроме того, гибель требовательных бактерий определяется созданием неблагоприятных для них условий, таких как неблагоприятные рН, окислительно-восстановительный потенциал, наличие или отсутствие свободного кислорода, а также действие антимикробных метаболитов, которые при определенных условиях могут образовывать актиноцеты, псевдомонады, эшерихии и другие содержащиеся в образце микроорганизмы.

Опыт создания и использования транспортных питательных сред велик и формально велика их номенклатура. Однако фактически в мировой практике стабильно используют только две транспортные среды, которые именуют по фамилиям их создателей: среда Эймса и среда Кери-Блейра, и которые являются наиболее универсальными транспортными средами для сохранения подавляющего большинства видов бактерий. Среда Эймса предназначена для широкого круга бактерий, среда Кери-Блейра для кишечных микроорганизмов.

Среда **Кери-Блейра** была предложена разработчикам в 1954 году. За прошедший длительный период ее рецептура фактически не менялась. Не вызывало разночтений и назначение среды — изначально оно трактовалось как сохранение микроорганизмов при транспортировании с акцентом на микроорганизмы кишечника.

Натрия хлорид	5,0 г
Динатрия гидрофосфат	1,1 г
Кальция хлорид	0,1 г
Натрия тиогликолят	1,5 г
Агар-агар	5,0 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 8,0 ± 0,5	

Микроорганизмы кишечника многообразны, они включают представителей резидентной и транзитной микрофлоры. Последняя в свою очередь может включать самые разнообразные бактерии и грибы, в т.ч. сапрофитные. В то же время, практика микробиологических служб клинических учреждений нацелена на выделение определенного круга микроорганизмов кишечника, прежде всего представителей семейства энтеробактерий (шигеллы, сальмонеллы), реже т.н. неферментирующих грамотрицательных бактерий, кишечных кокков и дрожжеподобных грибов.

Транспортная среда Кери-Блейра предупреждает гибель микробных клеток, сохраняет их жизнеспособность, но при этом препятствует размножению. Эти свойства среды обеспечиваются ее компонентным составом. Низкая питательная ценность и, прежде всего, отсутствие источников азота и углерода, как ключевых элементов развития популяции, ограничивает процессы роста и размножения микроорганизмов.

Процедура использования этой среды заключается в следующем: расплавленную среду Кери-Блейра разливают в стерильные пробирки по 6–9 мл. Объем среды в пробирках определяется техникой посева. При посеве мазка, взятого тампоном на тампонодержателе, достаточен небольшой столбик среды — 6 мл. При прямом посеве биоматериала (без тампона) объем среды в пробирке увеличивают. В таком виде среду можно длительно хранить при температуре 2 – 8°C.

Биологический материал погружают в столбик среды таким образом, чтобы он не оставался на ее поверхности. После этого пробирку с засеянной средой помещают в контейнер и направляют в лабораторию.

Среда Кери-Блейра сохраняет жизнеспособность требовательных бактерий около суток, после чего отмечают постепенную гибель клеток. Поэтому пересев с транспортной среды на обогащенные, дифференциально-диагностические или иные питательные среды необходимо



проводить в максимально доступные сроки. Вместе с тем, есть данные о том, что сальмонеллы в этой среде сохраняют жизнеспособность несколько месяцев.

**Среда Эймса** используется как транспортная для широкого круга микроорганизмов самых разнообразных биологических субстратов (гной, раневое отделяемое, мокрота, СМЖ и др.), кроме кала. Среда Эймса может быть с углем и без него:

Натрия хлорид	3,0 г
Динатрия гидрофосфат	1,05 г
Калия дигидрофосфат	0,2 г
Калия хлорид	0,2 г
Кальция хлорид	0,1 г
Магния хлорид	0,1 г
Натрия тиогликолят	1,0 г
Агар-агар	4,0 г
Древесный уголь (как необязательный компонент)	10,0 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
рН 7,2 ± 0,2	

Уголь добавляют в среду Эймса для сорбции микробных метаболитов, негативно влияющих на высокочувствительные патогенные микроорганизмы. В частности, это условие особенно важно для сохранения жизнеспособности гонококков.

Техника посева на среду Эймса такая же, как и на среду Кери-Блейра.

Противоречиво мнение о пригодности среды Эймса для транспортировки биосубстратов с облигатно-анаэробными бактериями. Безусловно, наличие низкого редокс-потенциала, который обеспечивается тиогликолятом натрия, а также столбик полужидкого агара, в который погружается биоматериал, ограничивают контакт микроорганизмов с атмосферным кислородом и поступление его в среду в растворенном виде, что может способствовать сохранению жизнеспособности ряда видов облигатно-анаэробных бактерий (наиболее демонстративны в этом отношении клостридии). Однако среда не обеспечит длительного сохранения тех облигатных анаэробов, которые высоко чувствительны к кислороду (например, некоторых видов бактериоидов).

Кроме отмеченных выше, имеется широкий перечень транспортных сред, применяемых для транспортирования определенных видов микроорганизмов. Наиболее строгие требования предъявляются к транспортированию материала, подлежащего бактериологическому исследованию на наличие неспорообразующих анаэробных микроорганизмов. Эти бактерии быстро погибают при контакте с кислородом воздуха, что заставляет использовать для транспортирования материала сосуды, заполненные инертным газом. Так, например, хорошо известна жидкая обогащенная среда под инертным газом с геминем и витамином К для прямого посева крови и жидких биосубстратов. Она служит одновременно транспортной средой и средой для культивирования анаэробных бактерий, включая строгих анаэробов

Ряд целевых транспортных сред включает в себя антимикробные агенты (селективный компонент). Эти вещества подавляют рост сопутствующей микрофлоры, но не действуют на искомый микроб. Остальные компоненты среды обеспечивают его жизнеспособность. Примером может служить среда для листерий, которая одновременно является «голодной» и содержит вещества селективного действия (дано на литр):

Натрия глицерофосфат	10,0 г
Натрия тиогликолят	1,0 г
Кальция хлорид	0,1 г
Налидиксовая кислота	0,04 г
Акридин	0,008 г
Агар-агар	2,0 г
рН 7,4 ± 0,2	

Значительно более «богатой» представляется среда для транспортирования кампилобактерий (т.н. Кампи ТХИО среда), состав которой включает пять антимикробных препаратов (дано на литр):

Панкреатический перевар казеина	20,0 г
Натрия хлорид	2,5 г

Дикалия гидрофосфат	1,5 г
Натрия тиогликолят	0,5 г
L-цистин	0,5 г
Натрий сернистоокислый	0,2 г
Цефалотин	0,02 г
Ванкомицин	0,02 г
Амфотерицин В	0,002 г
Триметоприм	0,002 г
Полимиксин В	3000 ЕД
pH 7,4 ± 0,2	

Приведенная пропись мало чем отличается от состава других питательных сред для кампилобактерий (см. заключительную главу). Очевидно, что разработчики среды сделали акцент, в первую очередь, на селекционирующем действии антибиотиков, сохранив, в целом, состав среды, достаточный для поддержания жизнеспособности многих микроорганизмов.

Такой же принцип использован в транспортной среде для хламидий. Кроме того, в ней учтена возможность применения для селекции осмотического фактора (дано на литр).

Сахароза	68,5 г
Дикалия гидрофосфат	2,1 г
Калия дигидрофосфат	1,1 г
Сыворотка крови крупного рогатого скота	50,0 мл
Ванкомицин	0,1 г
Стрептомицин	0,05 г
Нистатин	25000 ЕД
pH 7,0 ± 0,2	

Антибиотики и сыворотку асептично вводят в стерильную питательную среду перед ее разлитием во флаконы и пробирки.

Существует ряд достаточно сложных по составу транспортных питательных сред для нейссерий, микоплазм и их сочетаний преимущественно в биосубстратах, полученных из мочеполового тракта. Некоторые варианты рассматриваются как транспортные среды для требовательных бактерий в целом, но особенно для нейссерий. Пропись одной из них, принадлежащей к большой группе т.н. Transgrow Medium, приведена далее (дано на литр).

Гемоглобин	10,0 г
Панкреатический перевар казеина	7,5 г
Пептон	7,0 г
Глюкоза	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Кукурузный крахмал	1,5 г
Дикалия гидрофосфат	4,0 г
Калия дигидрофосфат	1,0 г
L-цистеин	0,3 г
L-цистин	0,01 г
L-глутамин	0,1 г
Аденин	0,01 г
НАД	0,002 г
Витамин В <sub>12</sub>	0,001 г
Тиамин пиродифосфат	0,001 г
П-Аминобензойная кислота	0,0002 г
Антибиотическая добавка	10,0 мл
Агар-агар	18,0 г
pH 6,8 ± 0,2	

Антибиотическая добавка включает ряд антибиотиков, призванных придать среде селективные свойства. Имеется ряд предложений, ни одно из которых в полной мере, естественно, не может обеспечить гарантированное подавление роста сопутствующих микроорганизмов. В

разных источниках наиболее часто упоминают следующий состав (на литр среды добавляют 10 мл раствора антибиотиков).

Полимиксин В	0,0075 г
Ванкомицин	0,0035 г
Триметоприм	0,0035 г
Нистатин	12500 ЕД

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что несмотря на большое число предложенных прописей транспортных сред, в микробиологической (медицинской) литературе наиболее часто упоминают среды Эймса и Кери-Блейра. Ряд авторов считает приемлемой среду Стюарта, которая, фактически, является предшественницей двух других. Среда Эймса большинству авторов представляется предпочтительней, чем среда Стюарта.

## ГЛАВА 8. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Среди возбудителей заболеваний человека энтеробактерии относятся к числу относительно нетребовательных микроорганизмов. Они способны давать рост на различных базовых питательных средах, используемых в микробиологических исследованиях. Однако семейство Enterobacteriaceae достаточно обширно; оно объединяет разные по своим свойствам бактерии. Кроме того, те области человеческого тела, где многие представители семейства являются объектом естественного обитания или паразитирования, обильно населены резидентной микрофлорой. Вот почему питательные среды, используемые при работе с энтеробактериями, в первую очередь решают задачу их селективного выделения и бактериологической диагностики. Это характерно как для отечественной, так и зарубежной практики.

Согласно многим отечественным методическим рекомендациям и указаниям, в том числе одобренных Минздравом, как обязательные при бакдиагностике энтеробактерий предложено использовать среды обогащения, среды для селективного выделения и дифференциации. Их перечень приведен в таблице. Названы те среды, которые освоены отечественными производителями, а также те из них, чье внедрение в микробиологическую практику признано перспективным.

Отечественные рекомендации в принципиальном плане мало отличаются от каждодневной практики применения питательных сред за рубежом. Питательные среды для энтеробактерий сконструированы таким образом, чтобы использовать ростовые особенности отдельных родов и видов и их способность конвертировать тот или иной субстрат. В следующей таблице 7 выборочно обобщены те свойства энтеробактерий, которые учтены и успешно реализованы в питательных средах для дифференциации микроорганизмов этого семейства.

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (1990 г.) в бактериологических лабораториях для работы с энтеробактериями рекомендованы следующие питательные среды:

**транспортные среды** — Эймса, или Кери-Блейра, или Стюарта;

**базовые среды** – кровяной агар, агар на переваре сои (tryptic soy agar);

**селективные и дифференциально-диагностические среды** — ацетатный агар, пептонная вода с реактивом Андресе, среда Клиглера, агар МакКонки, жидкая среда для определения уреазы и образования индола, среда с дезоксихолатом и цитратом, SS-агар (как альтернатива среды с дезоксихолатом), цитратный агар Симмонса. К этой же группе питательных сред может быть отнесен названный в перечне brotacin agar, более известный в России, как CLED-агар, выпускаемый НПО «Питательные среды», г.Махачкала (среда, содержащая цистин, лактозу и индикатор и дозированная по электролитному составу). Хотя, строго говоря, эта среда предназначена для выделения не только энтеробактерий.

Заслуживает упоминания еще один зарубежный опыт.

В практике работы микробиологов США при выделении энтеробактерий из кишечного содержимого предложено использовать следующие группы питательных сред.

1. Как **транспортную** — среду Кери-Блейра.

2. **Дифференциально-диагностические:** агар МакКонки и ЕМВ-агар (с эозином и метиленовым голубым).
3. **Умеренно селективные:** гектоен-энтеро агар, SS-агар (шигелла-сальмонелла агар), XLD-агар (с ксилозой, лизином и дезоксихолатом).
4. **Высоко-селективные** среды: агар с бриллиантовым зеленым и висмут-сульфит агар.

Естественно, что все перечисленное не исключает применения базовых питательных сред, прежде всего питательного агара с добавлением бараньих эритроцитов.

Назначение транспортной среды очевидно. Вторая группа сред позволяет отдифференцировать культуры, ферментирующие лактозу, от лактозонегативных. Следующая (умеренно селективная среда) обеспечивает рост сальмонелл и шигелл, в то время как рост других энтеробактерий частично или полностью подавляется. Последняя группа предназначена для выделения сальмонелл, но рост шигелл на них не гарантирован.

Таблица 6

**Питательные среды, наиболее часто используемые при выделении  
и дифференциации энтеробактерий**

Буферные растворы и среды для транспорта	Среды обогащения («накопительные»)	Селективные среды	Дифференциально- диагностические среды
Глицериновый буфер Фосфатный буфер Глицериново-солевой буфер Среда Эймса (без угля) Среда Кери-Блейра	Селенитовый бульон Среда Мюллера Среда Мюллера-Кауфмана Магнийевый бульон Среда Рапорт Жидкая среда МакКонки	Среда Плоскирева Среда МакКонки плотная* SS-агар Висмут-сульфит агар*	Среда Эндо Среда Левина Среда Вильсона-Блера Агар Симонса (Симмонса) Ацетатный агар Агар Кристенсена Агар Клигlera Среда Гисса с углеводами Среда Преуса (с мочевиной) Среды с аминокислотами (лизин, аргинин, фенилаланин, орнитин)

\* Среда обладает селективными и дифференцирующими свойствами.

Таблица 7

• Биохимические свойства энтеробактерий, которые можно выявить на специальных питательных средах\*

	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маннит	Сорбит	Арабиноза	Раффиноза	Рамноза	Ксилоза	Трегалоза	Дульцит	Салицин	Алонит	Инозит	Целлобиоза	Эритрит	Эскулин	Мелибиоза	Арабит	Малонат	Цитрат	Мочевина	Лизин	Аргинин	Орнитин	Фенилаланин
<i>E.coli</i>	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	±	-	
<i>Citrobacter freundii</i>	±	±	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	±	-	-	±	-	-	
<i>C.diversus</i>	±	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	±	-	±	+	-	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>E.cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	-	-	+	-	-	+	-	±	+	±	-	+	+	-
<i>E.agglomerans</i>	-	±	+	+	-	+	-	+	+	+	-	±	-	-	±	-	±	-	±	±	±	-	-	-	-	
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>K.oxytoca</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>P.mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-	-	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S.paratyphi A</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S.choleraesuis</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	+	-
<i>S.gallinurum</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>S.pullorum</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.flexneri</i>	-	-	-	+	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.boydii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.sonnei</i>	-	-	+	+	-	+	-	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	±	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	±	+	+	+	-	-	±	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	+	-

\* Дано по вариантам с типичными видовыми признаками:

+ признак характерен для 80% культур и более

± для 50% и более

для 10% и более

- единичных культур

Среди заслуживающих внимания отдельных рекомендаций и замечаний целесообразно отметить выделенную способность XLD-агара обеспечивать рост требовательных к ростовым факторам культур дизентерийных палочек. В то же время SS-агар для этой цели признан не пригодным. Среда с бриллиантовым зеленым не рекомендована для выделения *S.typhi* и *S.paratyphi*. В то же время висмут-сульфит агар назван как особо целесообразный для получения роста *S.typhi*.

Выделять чистую культуру и проводить идентификацию энтеробактерий (как возбудителей кишечных инфекций) рекомендовано при следующем росте на перечисленных выше питательных средах (цит.по А.Grasmick, *Clim.Micr.Proc.Handbook*, 1995).

1. Агар МакКонки	– бесцветные или прозрачные колонии
2. EMB-агар	– бесцветные или прозрачные светло-желтые (м.б. розоватые) колонии
3. HE-агар	– голубые или зелено-голубые колонии с черным или без него центром
4. XLD-агар	– красные колонии с черным или без него центром; колонии <i>S.typhi</i> могут быть розовые с оранжевым центром
5. SS-агар	– бесцветные колонии с черным центром или без него
6. Среда с дезоксихолатом	– прозрачные бесцветные колонии, иногда розоватые или светло-коричневые, с темным центром или без него
7. Среда с бриллиантовым зеленым	– красные, розовые или белые колонии, окруженные красной каймой
8. Висмут сульфит агар	– черные или зеленые колонии с коричнево-черной зоной вокруг или без нее

Завершая рассмотрение практики использования питательных сред для работы с энтеробактериями в США, следует пояснить, что скрывается за не всегда привычными для отечественной практики названиями. EMB-агар (с эозином и метиленовым синим) известен в России как агар (или среда) Левина. SS-агар также выпускается отечественными производителями, как альтернатива среде Плоскирева. Правда, следует отметить, что зарубежный вариант имеет несколько больший набор источников азота и в некоторых его модификациях соли желчных кислот заменены на дезоксихолат натрия. В целом, различия не носят принципиального характера. HE-агар (*hektoen enteric agar*) выпускается несколькими фирмами, но различия в рецептуре, в целом, незначительны. Приведенная далее дана по руководству R.Atlas (1997 г.): сахароза, салицин, пептон, дрожжевой экстракт, соли желчных кислот, натрия тиосульфат, аммонийный цитрат железа, фуксин кислый, бромтимоловый синий, некоторые соли, агар-агар, pH  $7,6 \pm 0,2$ . Среда обладает селекционирующим действием и позволяет дифференцировать колонии по ферментации сахаров и образованию сероводорода. XLD-агар включает ксилозу, лактозу и сахарозу, L-лизин, тиосульфат натрия, аммонийный цитрат железа, дрожжевой экстракт, дезоксихолат натрия, феноловый красный, хлористый натрий, агар-агар. Дифференциация бактерий идет не только по сахаролитическому действию и сероводороду, но и по образованию микробом лизиндекарбоксилазы.

Провести четкую грань между средами накопления (обогащения) и селективными средами сложно, поскольку большинство первых содержит селекционирующий компонент. Различие между ними скорее сводится к консистенции среды — среды обогащения являются жидкими.

Хотя в принципиальном плане среды обогащения могут быть созданы для многих родов (видов) энтеробактерий, наиболее распространенные варианты селективных накопительных сред предназначены для выделения сальмонелл, в меньшей степени — шигелл. Компонентами, определяющими избирательный рост сальмонелл, являются соли селенистой кислоты (селениты  $\text{NaHSeO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), желчь и соли желчных кислот (преимущественно дезоксихолат натрия), соли магния, препараты иода, некоторые красители (бриллиантовый зеленый).

Одна из прописей селенитового бульона выглядит следующим образом.

Натрий сернистокислый кислый	4,0 г
Пептон	5,0 г

Динатрия гидрофосфат, безводный	7,0 г
Натрия дигидрофосфат, безводный	3,0 г
Лактоза	4,0 г
Вода дистиллированная	1000 мл
pH 6,9 ± 7,1	

Эта пропись приведена в отечественных методических пособиях.

Установление в селенитовом бульоне необходимого показателя pH среды и, особенно, поддержание его на должном уровне в процессе роста культур требует точного соблюдения соотношения селенита и веществ, обеспечивающих буферные свойства и pH среды (лактоза, фосфаты). В этом отношении натрий селенистокислый кислый (гидроселенит натрия,  $\text{NaHSeO}_3$ ) имеет определенное преимущество перед селенистокислым натрием ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Однако последний также рекомендован в ряде прописей, и, как показал опыт некоторых лабораторий, может быть эффективно использован. Это вещество более доступно. Как правило, селекционирующее действие селенита достаточно для подавления роста эшерихий и энтерококков, обычной микрофлоры кишечного содержимого. Тем не менее, предлагается усилить селекцию путем добавления в среду бриллиантового зеленого (5 мг на литр среды без изменения концентрации селенита — 4,0 г на литр).

Для выделения *S.typhi* и *S.paratyphi* одним из крупных производителей питательных сред, фирмой Oxoid, рекомендовано заменить лактозу на маннит. Основой явились исследования, показавшие, что в этом случае возбудителей брюшного тифа и паратифа В выделяют чаще.

Для снижения токсического действия селенита на сальмонеллы предложено использовать L-цистин (20 мг на литр).

К числу признанных сред, способствующих преимущественному накоплению сальмонелл, относится бульон Мюллера (1923 г.), чаще используемый в модификации Кауфманна (1930 г.). Среда (бульон) Мюллера-Кауфмана в ее классической прописи (цит. по R. Atlas, 1997) включает:

Карбонат кальция	25,0 г
Натрия тиосульфат	40,7 г
Панкреатический перевар казеина	7,0 г
Пептон из сои	2,3 г
Сухая желчь	4,75 г
Раствор Люголя	19,0 мл
Бриллиантовый зеленый	9,5 мл 0,1% раствора
Вода	1000 мл

В процессе изготовления среды первоначально смешивают все компоненты, кроме раствора Люголя и бриллиантового зеленого. После стерилизации кипячением этот раствор может храниться в охлажденном состоянии. Перед употреблением стерильно добавляют два последних компонента и разливают раствор в пробирки.

Несколько отечественных методических рекомендаций предлагают иной подход к приготовлению среды. Вначале готовят среду Мюллера:

Карбонат кальция (сухой, стерильный)	25,0 г
Бульон Хоттингера (120 – 130 мг% аминного азота)	900,0 мл
Раствор Люголя	20,0 мл
Натрия тиосульфат 50% стерильный раствор	100,0 мл

Карбонат кальция растворяют в бульоне Хоттингера и стерилизуют 30 мин при 121°C. Затем в асептических условиях добавляют раствор Люголя и раствор тиосульфата натрия. После этого к 500 мл стерильной среды Мюллера добавляют 250 мл стерильной бычьей желчи и 50 мл 0,1% раствора бриллиантового зеленого. Смешивают и асептично разливают по пробиркам. Не стерилизуют. В отличие от зарубежной практики последнюю смесь называют средой Кауфмана (в зарубежной литературе средой или бульоном Мюллера-Кауфмана).

Среда Мюллера (без модификации по Кауфману) может сама по себе использоваться как накопительная для сальмонелл, однако, по ряду публикаций ее селективность недостаточна.

Агар МакКонки заслуживает упоминания в первую очередь как среда, нашедшая за рубежом самое широкое применение при работе с энтеробактериями. Она обладает как селективными, так и дифференциально-диагностическими свойствами. За почти 100-летний период после первого упоминания среды в медицинской литературе (1905 г) накопилось не менее

8 вариантов агара МакКонки и несколько прописей жидкой среды. Всех их объединяет обязательное присутствие в качестве селекционирующего вещества желчи, сахара (во всех случаях, кроме одного — лактозы) и индикатора. Ферментация сахара придает определенный цвет колониям, что служит дифференцирующим признаком. Варьируя содержание в среде желчи или ее компонентов с определенной концентрацией солей таурохолевой, гликохолевой и дезоксихолевой кислот, меняют степень селективности агара, в первую очередь по подавлению роста стафилококков, энтерококков и роению протей. Одна из типичных рецептов агара выглядит следующим образом (на литр).

Пептон	20,0 г
Лактоза	12,0 г
Желчь (соли желчных кислот)	5,0 г
Натрий хлористый	5,0 г
Нейтральный красный	0,075 г
Агар-агар	12,0 г
рН 7,2 ± 0,2	

Отдельного упоминания заслуживает агар МакКонки с сорбитом. В нем учтено, что токсигенные штаммы, такие как *E.coli* 0157 : Н7, продуцирующие веротоксин, не ферментируют сорбит. В то же время подавляющее большинство кишечных палочек иных сероваров (до 95%) сорбит ферментируют. Как те, так и другие утилизируют лактозу. Поэтому классический вариант агара МакКонки с лактозой для целей дифференциации в данном случае не пригоден. На среде с сорбитом токсигенные штаммы *E.coli* 0157 : Н7 дают бесцветные колонии, большинство других — розовые. Среда МакКонки с сорбитом может дополнительно содержать кристаллический фиолетовый как ингибитор роста кокковой флоры, включая энтерококки.

Еще одна среда, использующая селекционирующие свойства желчи, согласно отечественным методическим указаниям имеет следующий состав (среда Рапопорт или , что было бы исторически справедливо, — Рапопорт и Вайтруб):

Бульон мясопептонный или Хоттингера	900,0 мл
Желчь бычья	100,0 мл
Глюкоза	20,0 г
Индикатор Андреде	1,0 мл
рН 7,0 – 7,2	

Другой достаточно часто используемый селективный агент — соли магния (обычно хлористый магний). Одним из первых их использовал Раппапорт (не путать с отечественным специалистом, названным выше).

Среда с магнием имеет ряд модификаций, которые часто обозначают общим названием — бульон Раппапорт-Василиадис и, в зависимости от состава, используют как среду обогащения не только для сальмонелл, но и иерсиний (*Y.enterocolitica*). Селективность среды усиливают ведением в композицию малахитового зеленого и антибиотиков, а также варьируя содержание хлористого магния (от 13,0 до 40,0 грамм на литр).

Для выделения сальмонелл используют, в частности, среду следующего состава (на литр):

Магний хлористый	13,4 г
Натрий хлористый	7,2 г
Папаиновый перевар соевой муки	4,54 г
Калия дигидрофосфат	1,45 г
Оксалат малахитового зеленого	0,036 г
рН 7,0 ± 0,2	

Рекомендованная отечественными МУК магниевая среда содержит (на литр).

Пептон	4,2 г
Хлорид натрия	7,15 г
Калия дигидрофосфат	1,48 г
Магний хлористый	35,7 г
Бриллиантовый зеленый 0,5% раствор	0,9 мл



Достаточный потенциал селективности заложен в антибиотиках и некоторых других веществах синтетической природы, обладающих определенным спектром противомикробного действия. При выделении энтеробактерий, особенно из кишечного содержимого, антимикробные соединения в питательных средах позволяют подавить или существенно ограничить рост грамположительных микроорганизмов и грибов. Среди препаратов, активных в отношении кокков, в т.ч. энтерококков, прежде всего, следует упомянуть бензилпенициллин. Однако в силу достаточно частой высокой резистентности к нему стафилококков, особенно в госпитальных условиях, антибиотик целесообразно использовать в высокой концентрации (не менее 500 ЕД/мл). При этом нельзя исключить ограниченного подавления или временную задержку роста некоторых грамотрицательных бактерий (в основном эшерихий). Высоким ингибиторным потенциалом обладает ванкомицин (в концентрации 30 – 100 мкг/мл). В отечественной практике резистентные к нему штаммы стафилококков и энтерококков пока не известны. Однако следует считаться с нарастающим числом сообщений за рубежом о ванкомицинрезистентных энтерококках, особенно *E. faecium*. Среди пенициллиназоустойчивых пенициллинов наиболее перспективен оксациллин (100 – 200 мкг/мл); остальные антибиотики этой группы менее стабильны и в питательных средах могут быстро терять активность. Эта группа антибиотиков перспективна только для подавления стафилококков. Энтерококки к ним устойчивы.

Полимиксины, особенно полимиксин М, интересны как вещества, подавляющие рост грамотрицательных бактерий, но не протеев. Последнее определяет сферу их применения в качестве компонента питательной среды.

Среди противогрибных препаратов как селекционирующее вещество наиболее изучен амфотерицин В (5 – 30 мкг/мл). Антибиотик обладает широким спектром противогрибного действия и высокой удельной активностью. На бактерии препарат не действует даже в очень больших концентрациях.

Значительным антигрибным потенциалом обладают имидазольные производные. Однако опыт их применения как селекционирующих агентов пока мал.

Существует ряд прописей, сочетающих несколько противомикробных веществ, для выделения различных представителей кишечной флоры: эшерихий, сальмонелл, шигелл, кампилобактерий, энтерококков, некоторых облигатно анаэробных бактерий, лактобактерий. Они выпускаются во флаконах, содержимое которых рассчитано на литр питательной среды.

Приведенные выше питательные среды рассматриваются в большей степени как селективные, хотя некоторые из них являются одновременно и дифференциально-диагностическими. Это тем более так, если учесть, что селективность тоже служит диагностике. Как известно, имеется большая группа питательных сред, которые предназначены исключительно для дифференциации различных микроорганизмов, в том числе (если не сказать в значительной степени) представителей кишечной группы. Рассмотрим некоторые из них.

Самый широкий круг питательных сред, используемых при идентификации энтеробактерий, объединен общим названием среда Гисса. Справедливости ради надо отметить, что авторское название среды не вполне точно. Гисс (Hiss) предложил обогащенную среду (с бычьей сывороткой), «лакмусовой настойкой» и углеводом (инулин). Этот вариант был предназначен для работы с коринебактериями и для дифференциации пневмококков от стрептококков. В дальнейшем упрощенный вариант среды был предложен для дифференциации энтеробактерий. Возможно, это одна из причин, почему за рубежом название «среда Гисса» используется очень редко. Фигурируют «жидкая среда с углеводами», «среда для определения ферментации углеводов» и мн.др. названия. Существует около 20 вариантов среды, которые отличаются по углеводному компоненту и, что реже, индикатору. Литр среды содержит:

Пептон	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Индикатор Андрее	10,0 мл
Углевод	5,0 или 10,0 г
рН 7,4 ± 0,2	

Перечень возможных сахаров дан в таблице, приведенной выше (под термином «сахара» или «углеводы» обычно понимают моно-, ди- и трисахариды, а также некоторые многоатомные спирты — см. таблицу 8).

В зарубежных руководствах приводят более обогащенную пропись среды. Помимо названных выше компонентов добавлен 1,0 г мясного экстракта. С учетом не всегда высокого

качества пептона, поступающего на рынок, это добавление выглядит достаточно обоснованным и для отечественной практики. Во всех случаях среда должна быть проверена на ростовые свойства и на способность давать при росте культуры такой сдвиг рН в кислую сторону, при котором наблюдается изменение цвета индикатора. Последнее представляет собой наибольшую опасность для обогащенного варианта среды Гисса. При применении индикатора Андресе положительный контроль — красный цвет среды, отрицательный — желтый. При использовании фенолового красного: положительный контроль — изменение цвета в желтый, при отрицательном результате среда имеет розовую окраску. Тест-культуру выбирают в зависимости от углеводного компонента.

Среду Гисса наиболее часто готовят в виде бульона («пептонной воды»). Она может быть плотной или полужидкой (0,2 — 0,4% агар-агара).

Таблица 8

### Химическая природа некоторых «сахаров», применяемых в среде Гисса

Химическая группа	Название углевода или спирта
Пентозы	арабиноза, ксилоза, рамноза
Гексозы	глюкоза, инозит, фруктоза (левулеза)
Дисахариды	лактоза, мальтоза, сахароза, трегалоза
Трисахариды	раффиноза
Полисахариды	инулин, крахмал
Трехатомные спирты	глицерин
Четырехатомные спирты	эритрит
Пятиатомные спирты	адонит, арабит
Шестиатомные спирты	дульцит, инозит, маннит, сорбит
Глюкозиды	салицин, эскулин

В 1926 г. J.Simmons (Симмонс) предложил дифференциально-диагностическую среду, сохранившую свое значение до сегодняшнего дня. Некоторые микроорганизмы способны утилизировать в питательной среде цитрат, как единственный источник углерода. Они же ферментируют некоторые неорганические соли аммония. В процессе роста происходит изменение рН среды в щелочную сторону, от 7,6 и выше. Индикатор бромтимоловый синий при этом меняет окраску: среда из зеленой становится синей. Существует несколько прописей среды Симмонса, которые отличаются друг от друга аммонийной солью, составом солей, призванных поддерживать буферные свойства среды, количеством отдельных компонентов, показателем рН после стерилизации. В целом, однако, на конечный результат эти вариации влияют мало. Ниже приведена одна из наиболее упоминаемых прописей среды Симмонса (на 1 литр).

Натрия цитрат	2,0 г
Магния сульфат	0,2 г
Аммония дигидрофосфат	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Бромтимоловый синий	0,08 г
Агар-агар	15,0 г
рН 6,9 ± 0,2	

Цитрат в среде Симмонса утилизируют почти все культуры *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., многие серотипы *Salmonella* spp., но не *S.typhi*, *S.paratyphi*, *S.gallinarum*, *S.pullorum*. Не дают роста на среде Симмонса эшерихии и шигеллы.

Существенную информацию может дать жидкая питательная среда с малонатом (E.Leifson, 1933 г.). Она содержит два источника углерода: глюкозу, в небольшом количестве, но достаточном, чтобы обеспечить рост энтеробактерий, не ферментирующих малонат, и заметно большее количество натрия малоната. Микроорганизмы, утилизирующие малонат, как основной источник углерода, и, одновременно, аммонийную соль, как источник азота, изменяют рН среды в щелочную

сторону, что фиксируется по изменению окраски из зеленой в синюю (индикатор — бромтимоловый синий). Если микроб не ферментирует малонат, среда, благодаря ферментации глюкозы, меняет окраску на желтую. (Поскольку среда имеет несколько вариантов прописи, базовый цвет ее может быть зеленый, оливково-желтый). Существует среда, имеющая два источника азота, и среда без одного из них (только соль аммония). Второй вариант рассчитан на дифференциацию эшерихий и энтеробактеров. Обогащенный состав позволяет дифференцировать более требовательные микроорганизмы, в т.ч. серовары сальмонелл. Рецепт (на литр) включает следующие компоненты.

Натрия малонат	3,0 г
Натрий хлористый	2,0 г
Сульфат аммония	2,0 г
Дрожжевой экстракт	1,0 г
Глюкоза	0,25 г
Калия дигидрофосфат	0,4 г
Бромтимоловый синий	0,025 г
pH 6,7 ± 0,2	

Питательные среды позволяют дифференцировать энтеробактерии образующие и не образующие уреазу — фермент, гидролизующий мочевины.

Как известно, к первым относятся протеи, морганеллы, некоторые виды иерсиний и провиденсий. Ко вторым — эшерихии, сальмонеллы, шигеллы и мн.др.

В отечественной практике в ряде МУК предлагается среда с мочевиной по Преусу.

Бульон Хоттингера	1000 мл
Глюкоза	5,0 г
Мочевина (50% р-р)	20,0 мл
Бромтимоловый синий (0,2% водный р-р)	12,0 мл
Агар-агар	15,0 г
pH 7,0 ± 0,2	

Другая пропись — бульон для определения образования энтеробактериями уреазы (на литр).

Мочевина	20,0 г
Динатрия гидрофосфат	9,5 г
Калия дигидрофосфат	9,1 г
Дрожжевой экстракт	0,1 г
Феноловый красный	0,01 г
pH 6,8 ± 0,2	

Изменение цвета среды соответственно в синий (сине-зеленый) и красный говорит об образовании или отсутствии фермента.

Среда с феноловым красным имеет агаризованный вариант (без изменения приведенного выше компонентного состава).

Наряду с монофункциональными дифференциально-диагностическими средами широко применяют многофункциональные, позволяющие судить о микроорганизме сразу по нескольким признакам. К их числу относится давно известная и широко применяемая среда Клигlera (I.Kligler, 1917 г.). Состав одного из ее вариантов на литр:

Лактоза	10,0 г
Глюкоза	1,0 г
Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептон	15,0 г
Цитрат аммонийного железа	0,2 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	0,025 г
Натрия хлорид	5,0 г

Агар-агар 15,0 г  
pH 7,4 ± 0,2

Среда позволяет судить о принадлежности выделенной культуры бактерий по способности ферментировать один или другой углевод (или оба сахара), образовывать сероводород и газ. Среду Клигlera разливают в пробирки, скашивают таким образом, чтобы остался столбик среды, делают посев штрихами по скошенной части среды и уколом в ее столбик, после чего инкубируют 16 – 18 часов и далее до 2-х суток. Весовое соотношение сахаров подобрано таким образом, что если микроб не ферментирует лактозу, но ферментирует глюкозу, то цвет изменяется в желтый только столбика среды. Пожелтение скошенной части среды свидетельствует об утилизации лактозы. При образовании сероводорода среда чернеет. О наличии газа судят по разрывам в толще среды. Кроме того, по характеру роста вокруг посева углом (ограниченный или диффузный, распространяющийся на весь столбик среды) можно судить о подвижности микроорганизма.

Варианты среды Клигlera содержат разные источники азота. Вместо цитрата аммонийного железа предложен сульфат аммонийного железа. В некоторых случаях считают необходимым увеличить концентрацию лактозы до 20 г/л (при 1,0 г/л глюкозы).

В 1945 г. А.Найна предложил использовать среду, близкую по составу к среде Клигlera, но содержащую дополнительно третий углевод — сахарозу (10 г/л). Трактовка ферментации сахарозы ведется также, как лактозы, по изменению цвета (желтый) скошенной части агара.

Еще более сложный состав имеет вариант трехсахарного агара по И.С.Олькеницкому (с мочевиной). Дано на литр среды.

Глюкоза	1,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Мочевина	10,0 г
Сульфат аммонийного железа	0,2 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар-агар	25,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

Используют среду также, как агар Клигlera. Красный цвет среды свидетельствует о наличии фермента уреазы, желтый — об его отсутствии и о ферментации сахаров. Красная окраска среды (наличие уреазы) требует применения дополнительно трехсахарного агара без мочевины. Трактовка остальных признаков (почернение среды, разрывы среды) такая же, как при применении среды Клигlera.

Отдельную группу составляют питательные среды для иерсиний (речь, прежде всего, идет об *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*). Они отличаются от сред для других энтеробактерий. Иерсинии дают рост на ряде известных сред (например Эндо), но и в России, и за рубежом предпочтительными считаются несколько индивидуальных рецептур. Согласно отечественным МУК рекомендуют использовать среду Серова и среду с бромтимоловым синим.

Дифференциально-диагностическая среда Серова (на литр).

Глюкоза	0,5 г
Мочевина	0,25 г
Молибденовокислый аммоний	0,1 г
Сода безводная	0,1 г
30% водный раствор сухой желчи	2,0 мл
Конго-рот 1,6% водный раствор	0,8 мл
Генцианвиолета 1% водный раствор	0,1 мл
Агар-агар	35,0 г

Иерсинии двух названных выше видов образуют на среде Серова матовые колонии с неровным краем и выпуклым центром от 0,2 до 2,0 мм в диаметре.

Среда с бромтимоловым синим имеет следующий состав (на литр).

Желчь медицинская	20,0 мл
Раствор едкого натра 4%	10 – 12 капель
Глюкоза	10,0 г

Мочевина	5,0 г
Сухой питательный агар бромтимолового синего	35,0 г
1,6% спиртовой р-р	8,0 мл

Через 24 ч роста образуются круглые гладкие колонии голубого цвета 0,1 – 0,2 мм в диаметре. Через 2 суток колонии достигают 2 мм в диаметре, край фестончатый, выпуклый центр, фон среды — темно-голубой. При взятии петлей колонии сдвигаются по агару.

В зарубежных руководствах наиболее часто в качестве основной диагностической и селективной среды фигурирует CIN-агар, имеющий следующий состав (на литр).

Пептон	20,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Натрия хлорид	1,0 г
Натрия пируват	2,0 г
Магния сульфат	0,01 г
Натрия дезоксихолат	0,5 г
Маннит	20,0 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,001 г
Агар-агар	0,5 г
рН 7,4 ± 0,2	

В качестве селекционирующей добавки предложено использовать цефсулодин, новобиоцин, иргасан (триклозан). Следует отметить, что оба антибиотика не только в России, но и в мировой практике сегодня выпускаются и используются только в реактивном варианте, что резко влияет на их стоимость и доступность. Целесообразно пользоваться другими цефалоспорины I поколения, макролидами, гликопептидами, пенициллинами, в спектр действия которых иерсинии не входят (естественно, с учетом рациональной концентрации).

Существует ряд других рецептов в которых дезоксихолат натрия является обязательным компонентом. В частности, предложен вариант SS-агара, который, наряду с солями желчных кислот, содержит дезоксихолат (т.н. SSDC-агар).

Следующий вариант среды со щелочным рН рекомендован в качестве накопительной для иерсиний (дано на литр).

Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	20,0 г
Динатрия гидрофосфат	7,1 г
Натрий хлористый	1,0 г
Калий хлористый	1,0 г
Магний сернокислый	0,01 г
Кальций хлористый	0,01 г
рН 8,3 ± 0,2	

Рост иерсиний на этой среде идет более интенсивно, чем других микроорганизмов.

В заключение следует подчеркнуть еще раз, что приведенный перечень питательных сред для энтеробактерий, общее число которых очень велико, призван лишь продемонстрировать разнообразие подходов к их конструированию и напомнить о составе ряда известных интенсивно применяемых вариантов.

## ГЛАВА 9. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОБЛИГАТНО АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

К облигатно анаэробным бактериям принадлежит большая группа самых различных микроорганизмов, которые объединены по общему типу дыхания (тоже далеко не в полной мере совпадающему). Поэтому и питательные среды для выделения и культивирования облигатно анаэробных бактерий достаточно разнообразны. Применительно к работе с теми микроорганизмами, которые являются возбудителями патологии человека, можно отметить несколько общих для используемых питательных сред свойств. Они, как правило, достаточно

«богаты», содержат большое количество источников белкового питания. Они имеют определенный редокс-потенциал, должны быть восстановлены. Очень часто требуются стимуляторы роста бактерий, которые вводят в состав питательных сред, равно как и селекционирующие вещества, поскольку менее требовательные микроорганизмы препятствуют росту анаэробов.

Среди питательных сред для отдельных групп облигатно анаэробных бактерий, как и для прочих микроорганизмов, могут быть выделены среды общего назначения, селективные среды и дифференциально-диагностические питательные среды. Часто присущие той или иной группе свойства совмещены, и среда имеет полифункциональное назначение.

Согласно рекомендациям Научно-методического центра по клинической лабораторной диагностике (В.И.Кочеровец, В.С.Михайлова и др., 1996 г.) в качестве базовой питательной среды предложен анаэробный гемагар на основе эритрит-агара следующего состава (на литр).

Эритрит-агар	36,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
Аммоний сернокислый	0,4 г
Натрий углекислый кислый	1,0 г
Гемин (1% раствор)	1,0 мл
Твин 80	1,0 мл
Витамин К <sub>1</sub> (1% раствор)	1,0 мл
Кровь лизированная цитратная	50,0 мл
рН 7,2	

Два последних компонента вносят в расплавленную и охлажденную до 50° среду непосредственно перед ее разливом в чашки Петри.

Другой вариант обогащенной питательной среды авторы предлагают готовить на основе промышленной среды для контроля стерильности, известной также, как тиогликолевая среда. Для этого ее (17,0 г) готовят в литре бульона Хоттингера с 50 мг% аминного азота, добавляют пептон (5,0 г), экстракт кормовых дрожжей (2,5 г), натрий хлористый (1,8 г), аммоний сернокислый (0,4 г), крахмал растворимый (1,0 г), гемина раствор 1% (1,0 мл), агар-агар (16,0 г), а перед разлитием охлажденной среды по чашкам — витамин К<sub>1</sub> (1,0 мл 1% раствора) и 50 мл лизированной крови.

Среде могут быть приданы селективные свойства добавлением налидиксовой кислоты из расчета 30 мкг/мл или канамицина (1 мг/мл) и желчи (20 г на литр). В последнем случае среда рекомендована для выделения *V.fragilis* и близких к ней по свойствам бактериоидов.

Обогащенную среду для определения стерильности без агара предлагают использовать для выделения и культивирования анаэробов во всех случаях, когда необходим ее жидкий вариант.

Среда для контроля стерильности	33,0 г
Гемин (1% раствор)	1,0 мл
Витамин К <sub>1</sub> (1% раствор)	1,0 мл
Твин 80	1,0 мл
Гидролизат Хоттингера 50 мг% аминного азота	1000,0 мл

Тиогликолевая среда, применяемая за рубежом (ТНЮ-medium), имеет много совпадающих характеристик с отечественным вариантом тиогликолевой среды и, практически, очень близка по композиции среде для анаэробов, выпускаемой НИЦФ (дано на литр).

Пептон	20,0 г
Глюкоза	6,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
L-цистин	0,25 г
Натрия тиогликолят	0,5 г
Натрия сульфит	0,1 г
Натрия бикарбонат	1,0 г
Агар-агар	0,7 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,0001 г
Гемин	0,005 г
Сыворотка крови (кролика, лошади)	100,0 мл
рН 7,2 ± 0,2	

Три последних компонента стерильно вводят в готовую основу тиогликолевой среды.

Приведенная пропись далеко не единственная. Среда имеет ряд вариантов: в основном меняют источники азота (дрожжевой экстракт, гидролизат сои, пептоны на основе различного сырья и т.п.). Отличия касаются также содержания агара (оно может быть большим, до 0,1%), причем он рассматривается как средство предотвращения окисления среды, что особенно важно для размножения анаэробных бактерий.

Исторически одной из первых сред, предложенных для культивирования облигатно анаэробных бактерий (патогенных клостридий) и сохранивших свое значение до сегодняшнего дня, явилась среда Китт-Тароцци. Надо отметить, что и до исследований ее создателей был достаточно большой перечень сред, используемых для работы с анаэробами (среды Stickel и Meyer, Wolf, Sftt и др.), но современные микробиологи о них не знают. Любопытно, что тогда именно в этом случае были популярны питательные среды из высококачественных сортов рыбы (Harde и Hauser). Как не вспомнить нынешние среды на основе гидролизатов рыбной муки или кильки. Сегодня не существует классической прописи среды Китт-Тароцци. Есть принцип, который заключается в приготовлении печеночного бульона на основе мясной среды, например, мясо-пептонного бульона, мясной воды или бульона Хоттингера. Кроме того, в конечном виде среда должна представлять собой столбик бульона с кусочком печени (или мяса) на дне пробирки.

Мясо-пептонный бульон (на основе мяса говяжьего)	1000,0 мл
Печень КРС	350,0 г
Глюкоза	20,0 г
рН 7,2 ± 0,2	

Бульон разливают по пробиркам, добавляют кусочек печени 2,0 – 2,5 г, заливают поверх 1 мл вазелинового масла. Кусочек печени можно заменить на такой же фрагмент мяса.

Вместо МПБ может быть взят печеночный бульон. Его готовят из 500 г печени на литр воды. Добавляют 10,0 г пептона и 5,0 г хлорида натрия. Приготовленный бульон разливают по пробиркам с кусочком печени или мяса и заливают вазелином. За рубежом похожая среда обозначена как бульон из рубленой печени (состав на литр).

Свежая печень КРС	500,0 г
Пептон	10,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
рН 7,0 ± 0,2	

Бульон предназначен для культивирования анаэробных бактерий, в первую очередь патогенных клостридий.

Печеночный бульон с МПБ взят за основу еще одной известной много лет среды Блаурокка. Далее приведена одна из ее наиболее известных модификаций (Г.И.Гончарова).

Печеночный бульон на основе МПБ*	1000,0 мл
Лактоза	10,0 г
Агар-агар	0,75 г
L-цистин	0,1 г
Твин 80	1,0 мл
рН 7,2 – 7,4	

(\* см.среду Китт-Тароцци)

Среда используется при выделении и, что наиболее важно, определении количества бифидобактерий в кишечном содержимом.

В определенной степени вариантом среды Китт-Тароцци является бульон с рубленным (chopped) мясом и глюкозой, нашедший достаточно широкое распространение за рубежом, особенно в США. Среда применяется по целому ряду показаний, среди которых получение роста разнообразных анаэробных микроорганизмов, в том числе при малом количестве клеток в посевном материале или наличии каких-либо ингибирующих факторов. Она рекомендована АТСС (Американской коллекцией типовых культур) для сохранения и пересевов многих облигатно анаэробных бактерий, в том числе бактероидов, бифидобактерий и клостридий. Признано, что среда наилучшим образом сохраняет токсигенность культур, в том числе *S.botulinum*. Бульон имеет несколько прописей; изменения, в основном, касаются содержания сахаров (это не

обязательно глюкоза и не обязательно только один сахар) и стимулирующих добавок. Представленная ниже пропись рекомендована АТСС, она является наиболее простой по композиции (дано на литр).

Мясо КРС или лошади (без жира)	500,0 г
Натрия гидроокись (1 N)	25 мл
Пептон	30,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	5,0 г
Резазурин (0,025% раствор)	4,0 мл
pH 7,0 ± 0,1	

Пробирки с кусочками мяса на дне заполняют 7 мл мясной вытяжки, обращая особое внимание на восстановленный редокс-потенциал среды (работа в атмосфере N<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>).

Более «богатые» прописи среды содержат L-цистеин, гемин, витамин K<sub>1</sub>. Плотная среда включает агар-агар. Используемые сахара — глюкоза, мальтоза, целлобиоза, крахмал. Для работы с эубактериями рекомендована эта же среда с добавлением аргинина или твина 80.

Большое внимание уделено питательным средам для культивирования неспорообразующих облигатно анаэробных бактерий. Особенно часто упоминаются бактериоды, возможно в силу их важной роли в патологии человека с одной стороны и высоких требований к качеству и составу питательных сред с другой. Некоторые среды предложены для выделения и культивирования фузобактерий, превотелл и др. анаэробных микроорганизмов. В приведенной далее таблице 9 отображены рекомендации одного из фундаментальных зарубежных практикумов, дающих представление о разнообразии питательных сред для работы с облигатно анаэробными бактериями — возбудителями заболеваний человека. Далее будет приведен состав некоторых из них.

Таблица 9

### Питательные среды для работы с облигатно анаэробными микроорганизмами

(адаптировано; по «Clinical Microbiology Procedures Handbook», 1995 г.)

Название питательной среды	Аббревиатура или иное название среды	Назначение питательной среды
Сердечно-мозговая плотная среда	VNI-agar	Среда общего назначения. Должна быть обогащена гемом и витамином K. Обеспечивает рост облигатно- и факультативно анаэробных бактерий.
Бруцелла-агар с кровью	—	То же
Анаэробный кровяной агар	CDC anaerobe agar	Среда общего назначения (см. выше). Особо выделяется, как оптимальная для грамположительных анаэробных бактерий.
Агар Шедлера с кровью	Schaedler's agar	Среда общего назначения, обогащенная (см. выше). Считается оптимальной для выделения требовательных анаэробных бактерий.
Канамицин-ванкомицин кровяной агар	LKV-agar KLVB-agar	Для изоляции и селекции бактериодов и обнаружения пигментообразующих грам-отрицательных палочек. Обогащена гемом, витамином K <sub>1</sub> и лаковой кровью.
Фенилэтилалкоголь агар	PEA	Селективная среда. Подавляет рост факультативно анаэробных грамотрицательных палочек
Бактериодный желчно-эскулиновый агар	BBE-agar	Для селективного выделения и предварительной идентификации бактерий группы <i>B. fragilis</i>
Яично-желточный агар (вар. яично-желточный агар с неомисином)	EYA (NEYA)	Селективная и диагностическая среда для клостридий, а также для других анаэробов (некоторые виды превотелл и фузобактерий), образующих липазу и лецитиназу.



Бруцелла агар с цефокситином, циклоспорином и фруктозой	ССФА	Селективная и диагностическая среда для <i>Clostridium difficile</i>
Тиогликолевая среда, обогащенная	ТНЮ medium	Среда с малым количеством агара, обогащенная геминном, витамином К, а также сывороткой крови (по показаниям). Для многих видов анаэробных бактерий.

В зарубежной практике для выделения и культивирования неспорообразующих облигатно анаэробных бактерий в качестве базовых питательных сред часто называют агар Шедлера (Schaedler agar), среду для бруцелл, обогащенную кровью, витамином К и геминном (ее пропись приведена в разделе питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам), анаэробный кровяной агар (CDC anaerobic agar).

Агар Шедлера включает (на литр)

Казеиновый пептон	5,7 г
Соевый пептон	1,0 г
Мясной пептон	2,5 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Глюкоза	2,8 г
Гемин	0,01 г
L-цистин	0,4 г
Трис-буфер	3,0 г
Натрия хлорид	5,7 г
Дикалия гидрофосфат	0,8 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,01 г
Баранья кровь	50,0 мл
Агар-агар	15,0 г
pH 7,6 ± 0,2	

Кровь добавляют стерильно в приготовленную, расплавленную и охлажденную до 45°C среду перед разлитием в чашки Петри. Среда имеет несколько не отличающихся принципиально прописей, что не меняет ее назначения.

Для выделения и первичной идентификации *B. fragilis* и других представителей близкой к ней группы бактероидов нашла применение агаризованная желчно-эскулиновая среда (BBE-agar) следующего состава (на литр).

Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Перевар соевой муки	5,0 г
Желчь сухая	20,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Эскулин	1,0 г
Цитрат аммонийный железа	0,5 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,01 г
Гемин	0,125 г
Гентамицин	0,1 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,0 ± 0,2	

Гемин, витамин К<sub>1</sub> и гентамицин вводят в готовую и охлажденную до 45 – 50°C среду. Желчь выполняет селекционирующую функцию (*B. fragilis* дает рост на средах с желчными солями). Гидролиз эскулина (с образованием эскулетина) в сочетании с солью железа придает черно-коричневую окраску среде вокруг колоний. Сами колонии *B. fragilis* и представителей ее группы округлые, имеют серую окраску и достигают диаметра 1 мм или более.

Имеется несколько других прописей, декларируемых как среды для бактероидов, которые, однако, не имеют в своем составе селективных или диагностических компонентов, а представляют собой обогащенные варианты сред обязательно с геминном и витамином К<sub>1</sub>.

В качестве среды, обеспечивающей рост широкого круга анаэробных бактерий, включая бактериоды, и, в то же время, обладающей селективными свойствами, предложена среда, содержащая фенилэтиловый спирт в качестве селекционирующего агента. Последний подавляет рост факультативно анаэробных микроорганизмов, в т.ч. энтеробактерий. Среда известна как фенилэтилалкоголь агар или РЕА-агар. Ее состав на литр.

Перевар соевой муки (папаиновый)	23,0 г
Глюкоза	1,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Гемин (1% раствор)	10,0 мл
L-цистин	0,4 г
Витамин К <sub>1</sub> (1% раствор)	1,0 мл
Агар-агар	15,0 г
Фенилэтиловый спирт	2,7 мл
Кровь баранья	50,0 мл
рН 7,0 ± 0,2	

Два последних компонента добавляют в готовую, расплавленную и охлажденную до 45 – 50°C среду непосредственно перед приготовлением чашек.

Для выделения фузобактерий предложена селективная среда с антибиотиками, FAA-среда (в некоторых работах она помечена как среда для требовательных анаэробов). Ее состав на литр

Пептон	23,0 г
Глюкоза	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
L-аргинин	1,0 г
Натрия пируват	1,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
L-цистина гидрохлорид	0,5 г
Натрия сукцинат	0,5 г
Натрия гидрокарбонат	0,4 г
Натрий фосфорнокислый пиро	0,25 г
Гемин	0,05 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,01 г
Неомицин	0,1 г
Ванкомицин	0,005 г
Джозамицин	0,003 г
Агар-агар	12,0 г
Кровь баранья дефибринированная	50,0 мл
рН 7,2 ± 0,2	

Эта же среда без антибиотиков предложена для культивирования широкого круга анаэробных бактерий. Некоторые авторы считают достаточно вводить в среду только неомицин (0,1 г/л) и ванкомицин (0,0075 г/л) для селективного выделения фузобактерий.

Селективными и, одновременно, диагностическими свойствами обладает среда для *Fusobacterium necrophorum* следующего состава (на литр).

Панкреатический перевар казеина	32,0 г
Пептон	12,0 г
Магний сернокислый	5,0 г
Динатрия гидрофосфат	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Кристаллический фиолетовый	0,023 г
Агар-агар	16,5 г
Эмульсия яичного желтка (50%)	90,0 мл
Раствор фенилэтилового спирта (0,27%)	1,35 мл
рН 7,3 ± 0,2	

Эмульсия яичного желтка готовится следующим образом. Обрабатывают антисептиком 24 яйца. У 22 из них отделяют яичный желток и смешивают его с содержимым 2 других яиц. Добавляют 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Тщательно смешивают.

Аналогичный принцип заложен в пропись еще одной селективной и диагностической среды, рекомендованной к использованию Американским микробиологическим обществом. Среда известна как яично-желточный агар с неомисином (Egg Yolk Agar) или как агар Lombard-Dowell (LD agar) с неомисином. Среда рекомендована для выделения *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia*, клостридий. LD agar является основой для многих вариантов питательных сред, используемых при работе с облигатно анаэробными бактериями. Состав ее на литр следующий.

Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
L-цистин	0,4 г
L-триптофан	0,2 г
Натрий сернистокислый	0,1 г
Гемин	0,01 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,01 г
Натрия гидроокись (1 N)	5,0 мл
Агар-агар	20,0 г
pH 7,5 ± 0,2	

Селективный и диагностический вариант среды, приведенной выше, включает

LD агар	900,0 мл
Яично-желточная эмульсия	10,0 мл
Магний сернокислый (5% раствор)	0,02 мл
Динатрия гидрофосфат	0,5 г
Глюкоза	0,2 г
Неомицина сульфат	0,01 г

Приготовление яичной эмульсии: смешивают содержимое 1 яйца с яичным желтком 11 яиц.

Эмульсию яичного желтка и неомисин вносят асептично в расплавленную и охлажденную до 45 – 50°C среду перед ее разлитием в чашки Петри.

Дифференциация анаэробов идет по их способности продуцировать липазу, лецитиназу и протеазы (образование преципитата вокруг колоний — лецитиназа, перламутровая переливающаяся окраска колоний — липаза, зона просветления вокруг колоний — протеаза).

Среди других вариантов LD агара значительным диагностическим потенциалом обладает также т.н. LD эскулин агар, имеющий следующий состав на литр.

Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
Эскулин	1,0 г
Железа цитрат	0,5 г
L-цистин	0,4 г
L-триптофан	0,4 г
Гемин	0,2 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,01 г
Натрия гидроокись (1 N)	1,0 мл
Агар-агар	20,0 г
pH 7,5 ± 0,2	

Микроорганизмы, гидролизующие эскулин, меняют окраску среды вокруг колоний от красно-коричневой до темно-коричневой. Бактерии, продуцирующие H<sub>2</sub>S образуют колонии черного цвета.

Для бактерий, дающих рост в присутствии желчи (*B.fragilis* и ее группа), предложен вариант этой же среды, содержащий сухую желчь или соли желчных кислот. Он имеет много

общего с составом среды, уже приведенной ранее. Жидкий вариант (бульон LD) предложен для культивирования различных облигатно анаэробных бактерий.

В отечественных методических рекомендациях, названных в начале этой главы, также дано несколько прописей диагностических питательных сред. Для определения лецитиназной (лецитовителлазной) и липазной активности рекомендована среда следующего состава.

Гидролизат Хоттингера (120 мг% аминного азота)	1000,0 мл
Динатрия гидрофосфат	5,0 г
Калия дигидрофосфат	1,0 г
Натрия хлорид	2,0 г
Магний сернокислый	0,1 г
Глюкоза	20, г
Гемин (1% раствор)	1 мл
Агар-агар	20,0 г
Взвесь желтка	200,0 мл
рН 7,6	

Взвесь желтка рекомендовано готовить, используя 1 желток на 200 мл физиологического раствора.

Для определения протеолитической активности анаэробных бактерий предложено использовать среду с желатином.

Гидролизат Хоттингера (120 мг% аминного азота)	1000,0 мл
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Желатин	100,0 – 150,0 г
L-цистеин солянокислый	0,25 г
Гемин (1% раствор)	1,0 мл
Витамин К <sub>1</sub> (0,01% раствор)	1,0 мл
рН 7,1 – 7,2	

Для определения сахаролитических свойств анаэробов рекомендовано пользоваться пептонно-дрожжевым бульоном с добавлением необходимого углевода. Пропись бульона следующая (на литр).

Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	10,0 г
Глюкоза или др.углевод	10,0 г
L-цистеин солянокислый	0,5 г
Гемин (1% раствор)	1,0 мл
рН 7,0	

К среде может быть добавлен резазурин как показатель редокс-потенциала. Подчеркивается необходимость вести работы в токе бескислородного газа. Прокипяченная (восстановленная) среда не должна иметь розовой окраски – резазурин в процессе кипячения должен быть обесцвечен.

В заключение приведем селективную и диагностическую среду, предложенную для выделения *Clostridium difficile*, которая имеет следующий состав (на литр).

Пептон	8,0 г
Гидролизат казеина	18,0 г
Глюкоза	1,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Фруктоза	6,0 г
Нейтральный красный	0,03 г
Циклосерин	0,5 г
Цефокситин	0,016 г
Агар-агар	15,0 г

pH  $7,4 \pm 0,2$

*S. difficile* устойчива к большинству противомикробных лекарственных средств. Поэтому в рецептуру введены антибиотики, подавляющие широкий круг бактерий кишечника, включая ряд облигатных анаэробов (цефокситин). Поскольку микроб изменяет pH среды в щелочную сторону, колонии и среда вокруг них приобретают желтый цвет.

## ГЛАВА 10. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ГРИБОВ

Грибы — многочисленная, обособленная группа микроорганизмов, имеющая эукариотичный тип строения клеток и характеризующихся четко выраженной дифференциацией вегетативного и репродуктивного мицелия. Исключение составляют дрожжи, представляющие собой одиночные клетки (или объединенные в цепочки) и необразующие типичного (истинного) мицелия.

Техника изучения грибов в принципе такая же, какая используется и при изучении бактерий, однако морфолого-физиологические особенности грибов обуславливают и некоторые ее отличия. Так, у грибов более длительное время генерации, а, следовательно, и продолжительность их культивирования значительно больше, чем у большинства бактерий.

Для роста грибов наиболее благоприятна слабощелочная реакция среды (5,0 – 6,0) и менее высокая температура инкубации, чем для бактерий. Многие грибы, в том числе и дерматофиты, хорошо растут при комнатной температуре.

У грибов часто проявляется неодинаковая потребность в разных источниках углерода для максимального роста мицелия, образования репродуктивных органов или определенных метаболитов. Это означает, что указанные признаки грибов находятся в прямой зависимости от состава питательной среды и выбор того или иного углеродосодержащего субстрата следует проводить с учетом интересующего контролируемого признака. Например, для стимуляции процесса спорообразования у дерматофитов используют казеиновый агар, обогащенный тиаминном.

Значительная часть сред для выделения грибов содержит селективные компоненты. Для подавления роста бактерий добавляют противобактериальные антибиотики или снижают pH среды. С целью подавления роста грибов, сопутствующих выделяемому виду, кроме противогрибных антибиотиков используют и другие фунгицидные препараты — бычью желчь, кристалл-виолет, пропионат кальция и др.

Из обширного числа известных питательных сред для выделения, хранения, идентификации и культивирования грибов в настоящем пособии возможно указать лишь некоторые из наиболее широко используемых и проверенных практикой медицинской микологии.

Широко используемой средой для выделения и культивирования как сапрофитных, так и патогенных грибов, является декстрозный агар Сабуро (г/л).

Глюкоза	40,0 г
Пептон	10,0 г
Агар-агар	20,0 г

pH  $5,6 \pm 0,2$

Благодаря низкому значению pH, рост бактерий на этой среде подавляется. Однако наибольшее распространение нашли среды, представляющие собой модификации оригинальной среды Сабуро, придающие ей дифференциально-диагностические свойства.

Известной модификацией, используемой в свою очередь в составе других сред, является модификация Эммонса, отличающаяся от оригинальной среды тем, что содержит только 2% глюкозы, вместо 4%, и pH на уровне нейтрального — 6,9 – 7,0. Добавлением к среде такого состава антимикробных препаратов в различных комбинациях, включающих циклогексимида, хлорамфеникол, гентамицин, ципрофлоксацин, пенициллин или стрептомицин для ингибирования роста некоторых грибов и бактерий, достигается ее селективность.

Агар Сабуро в модификации Эммонса с добавлением хлорамфеникола (50 мг/л) и циклогексимида (500 мг/л) является селективным и используется для выделения патогенных грибов из биообразцов, высококонтаминированных сапрофитными грибами и бактериями.

Эта среда встречается под коммерческими названиями *Mycobiotic agar* (Difco), *Mycosel agar* (BBL).

Для выделения, идентификации патогенных дерматофитных грибов (*Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*) широко используется так называемая тест-дерматофитная среда, известная за рубежом, как DTS — medium. Состав на литр.

Перевар соевой муки	10,0 г
Глюкоза	10,0 г
Феноловый красный	0,2 г
Кислота соляная 0,8 N	6,0 мл
Циклогексимид	0,5 г
Хлорамфеникол (левомецетин)	0,1 г
Гентамицин	0,1 г
Агар-агар	20,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

Циклогексимид ингибирует рост сапрофитных грибов, хлорамфеникол и гентамицин — рост бактерий. При росте дерматофитов среда изменяет окраску от желтой до красной, при этом легко выявляются их морфолого-культуральные признаки.

Для изоляции, культивирования и идентификации дерматофитов фирма Oxoid предлагает среду (Dermasel Agar Base), представляющую собой модификацию агара Сабуро следующего состава.

Микологический пептон	10,0 г
Глюкоза	20,0 г
Агар-агар	20,0 г
pH 6,9 ± 0,2	

Добавление к составу среды хлорамфеникола (0,05 г/л) и циклогексимида (0,4 г/л) делает среду селективной. Дерматофиты образуют колонии с характерной для них морфологией и пигментацией, а также типичные макро- и микроконидии.

В этой модификации агар Сабуро может быть использован для выделения и идентификации *Microsporum audouinii*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. lavum*, *T. rubrum* и *Candida albicans*.

Селективной средой, используемой для изоляции патогенных грибов от сопутствующей микрофлоры является агар Литтмана (Littman oxgall agar) (дано на литр).

Желчь бычья сухая	15,0 г
Пептон	10,0 г
Глюкоза	10,0 г
Кристаллический фиолетовый	0,01 г
Агар-агар	20,0 г
pH 7,0 ± 0,2	

После стерилизации добавляют 3 мл 1% р-ра стрептомицина.

Для выделения грибов рода *Trichophyton* предложено много иных сред.

Аммонийно-нитратный агар имеет следующий состав (на литр):

Аммония нитрат	1,5 г
Глюкоза	40,0 г
Магния сульфат	0,1 г
Калия дигидрофосфат	1,8 г
Агар-агар	20,0 г
pH 6,8 ± 0,2	

Молочно-глюкозный агар предложен для дифференциации *Trichophyton mentagrophytes* и *Microsporum* spp. Состав на литр.

Молоко обезжиренное, порошок	40,0 г
Глюкоза	20,0 г
Бромкрезоловый красный, 1,5% в спирте	1,0 мл
Агар-агар	20,0 г

Для выделения и разделения отдельных видов рода *Trichophyton* используют 7 тест-сред, основанных на использовании казеинового агара и аммиачно-нитратного агара с добавлением различных факторов роста.

1. Казеиновый агар (без витаминов)
2. Казеиновый агар плюс инозит
3. Казеиновый агар плюс инозит и тиамин
4. Казеиновый агар плюс тиамин
5. Казеиновый агар плюс никотиновая кислота
6. Аммонийно-нитратный агар
7. Аммонийно-нитратный агар плюс гистидин

Для этой цели используется, как основа, казеиновый агар следующего состава (на литр).

Кислотный гидролизат казеина	2,5 г
Глюкоза	40,0 г
Магния сульфат	0,1 г
Калия дигидрофосфат	1,8 г
Агар-агар	20,0 г
рН 6,8 ± 0,2	

Простая по составу рисовая среда, содержащая белый рис и деионизированную воду, используется для идентификации *Microsporium audouinii* и необразующих споры изолятов *Microsporium canis*.

Для выделения и культивирования таких требовательных патогенных грибов, как *Histoplasma capsulatum* и *Blastomyces dermatitidis* рекомендована, как наиболее подходящая, среда содержащая, кроме обычно используемых питательных компонентов, еще и сердечно-мозговой экстракт (*Brain heart infusion agar*). Состав на литр.

Сердечно-мозговой экстракт	8,0 г
Пептический перевар мяса	5,0 г
Панкреатический перевар казеина	16,0 г
Натрий хлористый	5,0 г
Глюкоза	2,0 г
Динатрий гидрофосфат	2,5 г
Агар-агар	13,5 г

Селективными компонентами среды являются антибиотики хлорамфеникол и гентамицин, которые ингибируют бактерии.

Питательная основа среды может быть обогащена овечьей кровью (10%).

Изолировать *Blastomyces dermatitidis* и *Histoplasma capsulata* от других микроорганизмов анализируемого биосубстрата возможно с использованием среды, содержащей дрожжевой экстракт и фосфатный буфер. Селективность среды создается добавлением антибиотика хлорамфеникола и гидроокиси аммония.

Состав среды с дрожжевым экстрактом (на литр).

Дрожжевой экстракт	1,0 г
Агар-агар	20,0 г
Хлорамфеникол	0,05 г

Состав фосфатного буфера.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 г
Дистиллированная вода	30,0 мл

Оба состава смешивают. Гидроокись аммония по каплям наносят на поверхность среды, после чего делают посев. Под действием хлорамфеникола и гидроокиси аммония подавляется рост бактерий, многих плесневых грибов и дрожжей, в результате чего возможно выявить рост медленно растущих диморфных грибов.

Циклогексимидчувствительные (патогенные) грибы *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, многие виды *Candida* выделяют, используя ингибиторный агар — обогащенную селективную среду следующего состава (на литр).

Панкреатический перевар казеина	3,0 г
Пепсиновый перевар мяса	2,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Крахмал	2,0 г
Декстрин	1,0 г
Хлорамфеникол	0,125 г
Натрия фосфат	2,0 г
Магния сульфат	0,8 г
Железа сульфат	0,04 г
Натрия хлорид	0,04 г
Марганца сульфат	0,16 г
Агар-агар	20,0 г

Для выделения, культивирования и идентификации дрожжей используются многие среды, в том числе декстрозный агар Сабуро (SDA) и ряд его модификаций, содержащие селективные добавки. Они приведены в расчете на литр среды.

Циклогексимид	0,5 г
Хлорамфеникол	0,05 г
Спирт этиловый, 95%	10,0 мл
Ацетон	10,0 мл

Питательный агар с эозином и метиленовым синим используют для быстрой идентификации *Candida albicans* в клиническом материале. Эту процедуру в значительной степени облегчает добавление хлортетрациклина гидрохлорида к составу среды.

Пептон	10,0 г
Лактоза	10,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,0 г
Эозин	0,4 г
Метиленовый синий	0,065 г
Агар-агар	15,0 г

pH  $6,8 \pm 0,2$

Изоляция дрожжей различных родов, различных видов *Candida* возможна на среде следующего состава (на литр).

Кукурузная мука	40,0 г
Агар-агар	20,0 г
Твин-80	10,0 мл

pH  $7,0 \pm 0,2$

Предварительно кукурузную муку вносят в 500 мл дистиллированной воды и нагревают в течение 1 часа при 65°C (или автоклавируют 10 мин при 121°C). После фильтрации объем доводят до 1 л и добавляют агар и Твин-80. Эта среда, как и картофельно-декстрозный агар применяется и для индукции спорообразования у грибов. Если в составе среды Твин-80 заменить на 10 г декстрозы, она может быть использована для разделения *Grichophyton mentagrophytes* от *Grichophyton rubrum* по такому признаку, как образование пигмента.

Указанные выше питательные среды, предназначенные для исследования патогенных микромицетов и дрожжей, составляют лишь незначительную часть от общего числа известных и представленных во многих зарубежных и отечественных руководствах, справочниках и других источниках



**ГЛАВА 11. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и другим антимикробным лекарственным средствам требует высокой стандартизации всех элементов анализа. Без этого невозможно получить достоверные, воспроизводимые результаты исследования со всеми вытекающими негативными последствиями для терапии больного. Сказанное в полной мере относится к питательным средам.

Существует два основных варианта определения чувствительности: метод серийных разведений и т.н. диск-диффузионный метод. Чаще используют последний, как наиболее доступный и технически, и экономически. Он основан на диффузии в засеянный изучаемым микробом питательный агар антимикробного вещества из картонных (бумажных) дисков. Питательная среда (гель) обеспечивает два параллельно идущих процесса: рост микроба и диффузию антимикробного средства. И тот, и другой должны идти в таком режиме, чтобы могла образоваться зона подавления роста микроба определенного размера в зависимости от чувствительности этого микроба к диффундирующему в гель антимикробному веществу. Если питательная среда не стандартна, если какие-либо компоненты ее изменяют рост микроба (например, ограничивают его или задерживают развитие популяции), если они препятствуют или, что тоже реально, ускоряют диффузию антибиотика в гель, то образующаяся зона окажется не информативной. Заключение о чувствительности микроба к антимикробному агенту будет ложным.

Другой метод серийных разведений основан на способности (или не способности) микроба размножаться в среде, содержащей определенное количество антимикробного средства. Устанавливают минимальную концентрацию, при которой роста популяции не происходит. Значение питательной среды в данном случае очевидно. Если она задерживает размножение микроорганизмов или, наоборот, стимулирует этот процесс, если она не обеспечивает стабильность антимикробного вещества или ингибирует его действие, качественный анализ провести невозможно. Метод серийных разведений может быть реализован и в жидкой и в плотной питательной среде, но это обязательно должна быть среда с определенными свойствами.

Круг питательных сред, которые применяют при изучении чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, сравнительно невелик. Определяется он в практическом плане в первую очередь тем, существуют ли для установленных условий проведения анализа (включая как важнейший компонент питательную среду) показатели интерпретации результатов анализа. На конкретной по составу среде при строго стандартной схеме исследования чувствительный штамм должен дать зону подавления роста не менее установленного диаметра или минимальная подавляющая концентрация должна быть не более строго определенной величины. То же для устойчивого или промежуточного по чувствительности микроорганизма. Питательная среда не может браться произвольно. Она должна быть определенного состава и обеспечивать надлежащий эффект при контрольном исследовании с референс-культурами.

В России при работе с дисками применяют среду АГВ. Она имеет следующий состав (дано на литр среды):

Питательный агар сухой	41,0 г
Крахмал растворимый	0,5 г
Динатрия гидрофосфат	3,5 г
Рн 7,2 – 7,6	

Предусмотренный прописью питательный агар каждый производитель выбирает свой в соответствии с утвержденными ФСЦП. Среда АГВ тестируется по ряду показателей, в том числе растворимости, прозрачности, рН, аминному азоту, прочности студня и др. Важным элементом является способность среды обеспечивать определенный размер зон подавления роста тест-культур вокруг дисков с антибиотиками (бензилпенициллин, карбенициллин, стрептомицин и некоторые другие). Это важнейший показатель ее качества.

В практике ряда зарубежных государств, а в последние годы в ограниченном объеме и в России, используется среда, предложенная двумя микробиологами США J.Muller и J.Hinton в 1941 г. для выделения нейссерий. В последнем качестве среда испытание временем по большому счету не выдержала. Зато она получила распространение при определении чувствительности

микроорганизмов к антибиотикам. Агаризованная (плотная) среда применяется для реализации диск-диффузионного метода, плотная среда или ее жидкий вариант — метода серийных разведений.

Следует обратить внимание микробиологов на то, что в литературе существует, по меньшей мере, до 7 прописей данной среды, в основе которых лежит исходная композиция. Одна из сред Мюллера-Хинтон предназначена для выделения легионелл, другая — хромобактерий, третья коринебактерий. Каждая имеет свои особенности. Для обсуждаемой темы — определение чувствительности, используют питательный агар следующего состава (дано на литр).

Инфуз (вытяжка из мяса говяжьего)	300,0 г
Гидролизат казеина кислотный	17,5 г
Крахмал	1,5 г
Агар-агар	17,0 г
pH 7,4 ± 0,2	

Определенное распространение получил также агар Мюллера-Хинтон II, в котором инфуз говяжьего мяса заменен на его экстракт. Он (по разным источникам) используется в количестве 2,0 или 3,0 г на литр. Мясной экстракт признан более стандартным, чем инфуз.

Бульон Мюллера-Хинтон имеет ту же пропись, что приведена выше, за исключением агар-агара.

Добавление 5% бараньей крови к среде Мюллера-Хинтон позволяет использовать ее для определения чувствительности стрептококков, включая пневмококки.

Агар Мюллера-Хинтон с добавлением 2% хлорида натрия рекомендован для определения чувствительности стафилококков к пенициллиназоустойчивым пенициллинам (оксациллин, клоксациллин и др.). Некоторые исследователи считают необходимым увеличить содержание хлорида натрия до 5 – 6%. С их точки зрения такая среда в большей степени позволяет диагностировать «метициллинрезистентность» стафилококков.

Обогащенный агар Мюллера-Хинтон (НТМ-агар) предложен для определения чувствительности к антибиотикам диск-диффузионным методом *Haemophilus influenzae*. Его пропись (на литр) включает следующие компоненты.

Инфуз из мяса говяжьего	300,0 г
Гидролизат казеина кислотный	17,5 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
НТМ добавка	10,0 мл
Агар-агар	17,0 г
pH 7,4 ± 0,2	

НТМ добавка включает (на 10 мл дистиллированной воды).

Никотинамид аденин динуклеотид	0,03 г
Гематин	0,03 г

НТМ добавка стерилизуется фильтрацией и вносится в расплавленную и охлажденную до 45 – 50°C питательную среду.

Бульон НТМ имеет ту же пропись, но без включения агар-агара. Его применяют при определении чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам методом серийных разведений.

В ряде публикаций в качестве питательной среды при тестировании *H. influenzae* диск-диффузионным методом использован шоколадный агар. Однако признано, что НТМ-агар дает более точные и воспроизводимые данные.

Жидкая питательная среда Мюллера-Хинтон является одной из основных для определения МПК методом серийных разведений (варианты макро- и микроразведений). Пропись ее приведена выше (см. пропись агаризованной среды Мюллера-Хинтон с исключением агар-агара).

Согласно рекомендациям NCCLS с целью получения достоверных данных при определении чувствительности микроорганизмов к некоторым антибиотикам (к тетрациклинам для многих культур и аминогликозидам применительно к *P. aeruginosa*) рекомендовано использовать жидкую среду Мюллера-Хинтон с утановленным содержанием катионов  $Ca^{++}$  (20 – 25 мг/литр) и  $Mg^{++}$  (10 – 12,5 мг/литр). Ее в ряде зарубежных руководств помечают как среду САМНВ (cation adjustment of Muller-Hinton broth). Растворы, содержащие необходимое количество

катионов, можно приготовить следующим образом. 8,36 г  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды. При этом в 1 мл будет 10 мг  $Mg^{++}$ . 3,68 г  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор будет содержать в 1 мл 10 мг  $Ca^{++}$ . Добавляя по 0,1 мл раствора увеличивают на 1 мг содержание в литре жидкой питательной среды Мюллера-Хинтон того или другого двухвалентного металла. Контроль за содержанием кальция и магния осуществляют с помощью прямых тестов физико-химического исследования или косвенно по МПК гентамицина при тестировании референс культуры *P.aeruginosa* ATCC 27853. При малых МПК необходимо введение в питательную среду катионов, как это обозначено выше, до получения необходимых (табличных) значений.

Определенную характеристику практики использования среды Мюллера-Хинтон в ее плотном и жидком вариантах дает таблица, в которой обобщены рекомендации Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США. Следует отметить, что за исключением грибов и облигатно анаэробных бактерий, названы все группы микроорганизмов, для которых имеются критерии оценки чувствительности и, соответственно, рекомендованы апробированные питательные среды.

Таблица 10

**Питательные среды, рекомендованные NCCLS к использованию при определении чувствительности бактерий к антибиотикам (по стандарту NCCLS M100-S9)**

Микроорганизм	Диск-диффузионный метод	Метод серийных разведений	
		в жидкой питательной среде	в плотной питательной среде
Enterobacteriaceae	МХА**	МХБ РКС***	МХА
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp</i> *	МХА	МХБ РКС	МХА
<i>Staphylococcus spp</i>	МХА	МХБ РКС	МХА
<i>Enterococcus spp</i>	МХА	МХБ РКС****	МХА
<i>Haemophilus spp</i>	НТМ агар	НТМ бульон	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	МХА + 5% крови барана	МХБ РКС + 2–5% лизированной крови лошади	—
<i>Streptococcus spp</i>	МХА + 5% крови барана	МХБ РКС + 2 – 5% лизированной крови лошади	МХА с 5% крови барана
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонококковый (GC) агар		Гонококковый (GC) агар с 1% стимулирующей рост добавки
<i>Vibrio cholerae</i>	МХА	МХБ РКС	

\* Для метода серийных разведений — все бактерии группы т.н. неферментирующих.

\*\* МХА — агар Мюллера-Хинтон.

\*\*\* МХБ РКС — бульон Мюллера-Хинтон с регулируемым катионным составом (см. текст).

\*\*\*\* Аминогликозидрезистентность определяется на сердечно-мозговой среде (см. текст).

Определение методом серийных разведений высокой устойчивости энтерококков к аминогликозидам, а также ванкомицинрезистентности рекомендовано проводить с использованием сердечно-мозгового агара или бульона (последний только для выявления аминогликозидрезистентности).

Базовый вариант агаризованной среды включает (на литр).

Вытяжку из сердца крупного рогатого скота	250,0 г
Вытяжку из мозга телят	200,0 г
Пептон	10,0 г

Натрия хлорид	5,0 г
Динатрия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза	2,0 г
Агар-агар	13,5 г

pH 7,4 ± 0,2

Бульон включает те же компоненты за исключением агар-агара.

В ряде прописей вытяжка из сердца и мозга заменена на единый высушенный продукт который добавляется в количестве 8,0 г/литр.

Другие многочисленные варианты плотной и жидкой среды, обогащенные переварами казеина и мяса, антибиотиками, витаминами и др. добавками предназначены для выделения и культивирования микроорганизмов, но не для определения их чувствительности.

Для определения чувствительности к антибиотикам методом дисков гонококков рекомендован ГК агар (гонококковый агар), за рубежом — GC medium. Следует обратить внимание на большое число питательных сред, помеченных аббревиатурой GC (более 15), причем это среды не обязательно предназначены для работы с гонококками. Кроме того, подразделяют ГК агар на его основу и обязательные добавки, без которых гонококк не будет давать роста или микробный газон окажется неудовлетворительным.

Базовая среда имеет следующий состав (на литр).

Пептон	15,0 г
Кукурузный крахмал	1,0 г
Дикалия гидрофосфат	4,0 г
Калия дигидрофосфат	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар-агар	10,0 г

pH 7,0 ± 0,2

В прописи АТСС (среда 1351) пептон заменен на панкреатический перевар казеина и пептический гидролизат мяса (по 7,5 г каждого).

В качестве добавок, обеспечивающих рост нейссерий, предложены дефибринированная кровь (5%), растворимый гемоглобин (1%), смесь аутолизата дрожжей с глюкозой, более сложные многокомпонентные добавки с витаминами, нуклеиновыми кислотами, солями, глюкозой. Согласно рекомендациям NCCLS может быть использован следующий состав (на литр).

L-цистин	1,1 г
Гуанин солянокислый	0,003 г
ПАБА	0,013 г
Витамин В <sub>12</sub>	0,01 г
Кокарбоксилаза	0,1 г
НАД	0,25 г
Аденин	1,0 г
L-глутамин	10,0 г
Нитрат железа	0,02 г

1% добавки вносится в питательную среду после автоклавирования.

Для определения чувствительности облигатно анаэробных бактерий методом серийных разведений в плотной среде используют обогащенные питательные среды, обычно применяемые для выделения микроорганизмов этой группы. Согласно стандарту NCCLS предложено пользоваться средой для выделения бруцелл, обогащенной кровью, витамином К и геминном. Состав среды на литр.

Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Пептон	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Глюкоза	1,0 г
Натрий сернистокислый	0,1 г
Витамин К <sub>1</sub>	0,001 г
Гемин	0,005 г

Кровь баранья дефибринированная	50 мл
Агар-агар	15,0 г
рН 7,0 ± 0,2	

В ряде исследований для этой же цели был взят мясо-пептонный агар, содержащий от 5 до 10% крови, глюкозу 1 – 2%, витамин К и гемин.

Для серийного титрования анаэробных бактерий рекомендованы также жидкие или полужидкие питательные среды, содержащие вещества, стабилизирующие их редокс-потенциал. В частности, один из таких «анаэробных» бульонов содержит (на литр)

Панкреатический перевар казеина	17,5 г
Глюкоза	10,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
Перевар соевой муки	2,5 г
Натрия тиогликолят	2,0 г
Натрия сульфоксилат	1,0 г
L-цистин	0,4 г
Метиленовый голубой	0,002 г
рН 7,2±0,2	

В отечественной и зарубежной литературе приведены исследования, выполненные с использованием тиогликолевой среды, обогащенной бульоном Хоттингера, и среды Китт-Тароцци (без добавления кусочков печени). Последнюю применяли при тестировании клостридий. Прописи этих сред приведены в главе, посвященной питательным средам для анаэробных бактерий.

Для определения чувствительности микроорганизмов диск-диффузионным методом предложен ряд других питательных сред, композиция которых предусматривает возможность роста с образованием достаточного газона самых различных (в том числе требовательных) бактерий. Как правило, это многокомпонентные, сложные по составу питательные среды. Некоторые прописи приведены далее.

DST-агар (агар для определения чувствительности). Выпускается фирмой Oxoid Unipath. Представляет собой вариант «богатой» среды, способной обеспечить рост широкого круга микроорганизмов. Состав среды (на литр).

Пептон	10,0 г
Экстракт из мяса телячьего	10,0 г
Глюкоза	2,0 г
Натрия хлорид	3,0 г
Динатрия фосфат	2,0 г
Натрия ацетат	1,0 г
Аденина сульфат	0,01 г
Гуанина гидрохлорид	0,01 г
Урацил	0,01 г
Ксантин	0,01 г
Тиамин	0,00002 г
Агар-агар	12,0 г
рН 7,4 ± 0,2	

К расплавленной и охлажденной до 50°C среде добавляют 70 мл дефибринированной лошадиной крови (в тех случаях, когда это необходимо для роста микроба).

Разработчики рассматривают данную среду как целесообразную не только для определения чувствительности бактерий, но и для диагностических целей.

В определенной степени ее вариантом является Sensitest Agar того же производителя, содержащий крахмал и панкреатический перевар казеина, а также многие компоненты DST-агара.

Обе среды относятся к числу первых питательных сред, использованных при определении чувствительности микробов к антибиотикам диск-диффузионным методом.

«Изо-сенситетст агар» (Iso-sensitest agar) выпускается по аналогичной прописи несколькими фирмами, но под разными названиями. Приведенная принадлежит Oxoid Unipath (дано на литр).

Гидролизат казеина	11,0 г
--------------------	--------

Пептон	3,0 г
Натрия хлорид	3,0 г
Динатрия гидрофосфат	2,0 г
Глюкоза	2,0 г
Натрия ацетат	1,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
Магния глицерофосфат	0,2 г
Кальция глюконат	0,1 г
L-Цистеина гидрохлорид	0,02 г
L-Триптофан	0,02 г
Аденин	0,01 г
Гуанин	0,01 г
Урацил	0,01 г
Никотинамид	3 мг
Пантотенат	3 мг
Пиридоксин	3 мг
Марганца хлорид	2 мг
Кобальта сульфат	1 мг
Меди сульфат	1 мг
Железа сульфат	1 мг
Менадион (вит.К)	1 мг
Цианкобаламин	1 мг
Цинка сульфат	1 мг
Биотин	0,3 мг
Тиамин	0,04 мг
Агар-агар	8,0 г

Среда считается пригодной для определения чувствительности к антибиотикам широкого круга бактерий. Подчеркивается, что его состав оптимален для этой цели. Она не требует добавления крови в тех случаях, когда это необходимо для роста микроба на других средах.

Определение чувствительности грибов к антимикробным препаратам остается одной из наименее изученных методических проблем. Часто используют метод серийных разведений в жидкой синтетической питательной среде сложного состава RPMI 1640, которая была создана для культивирования клеток млекопитающих, в том числе для вирусологических исследований при ВИЧ-инфекции. Один из ее вариантов, пропись которой приведена в таблице 11, по рекомендации американских исследователей нашел применение для тестирования чувствительности дрожжеподобных грибов и криптококка к узкому кругу противогрибных препаратов (флюконазол, итраконазол, флюцитозин, кетоконазол, амфотерицин В).

В последние годы ведется интенсивная работа по внедрению метода дисков для определения чувствительности грибов к противогрибным препаратам. Для этой цели используют среду Сабуро, агар Мюллера-Хинтон, мясо-пептонный агар. Обращено особое внимание на значение pH среды. Для каждого из препаратов этот показатель индивидуален и должен быть учитываем при выборе питательной среды. Возможность применения «метода дисков» при определении чувствительности грибов к противогрибным препаратам сегодня у многих исследователей сомнений не вызывает, однако, вопрос о рациональной для этой цели питательной среде пока остается открытым.

Таблица 11

### Состав среды RPMI 1640

Компоненты	г/л	Компоненты	г/л
L-аргинин	0,2	Биотин	0,0002
L-аспарагин (безводный)	0,05	Пантотенат	0,00025
L-аспарагиновая кислота	0,02	Холин хлорид	0,003

L-цистин 2HCl	0,0652	Фолиевая кислота	0,001
L-глутаминовая кислота	0,02	Инозит	0,035
L-глутамин	0,3	Никотинамид	0,001
L-глицин	0,01	ПАБА	0,001
L-гистидин	0,015	Пиридоксин солянокислый	0,001
L-гидроксипролин	0,02	Рибофлавин	0,0002
L-изолейцин	0,05	Тиамин солянокислый	0,001
L-лейцин	0,05	Витамин B <sub>12</sub>	0,000005
L-лизин HCl	0,04	Нитрат кальция	0,1
L-метионин	0,015	Хлорид калия	0,4
L-фенилаланин	0,015	Сульфат магния	0,04884
L-пролин	0,02	Хлорид натрия	6,0
L-серин	0,03	Фосфат натрия	0,8
L-треонин	0,02	Д-глюкоза	2,0
L-триптофан	0,005	Глутатион (восстановленный)	0,001
L-тирозин	0,02883	Феноловый красный	0,0053
L-валин	0,02		

## ГЛАВА 12. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛЕКАРСТВ

Микробиологическая чистота (микробная загрязненность) лекарств — это серьезная проблема, способная привести к вспышке инфекционной патологии или осложнить течение заболевания. Об этом хорошо информированы микробиологи, работающие в фармацевтической промышленности, но далеко не все клинические микробиологи. Пристальное внимание на этот вопрос обратили в середине 60-х годов, когда в Стокгольме более 200 человек, принимавших таблетки с экстрактом щитовидной железы, заболело сальмонеллезом. С тех пор анализ лекарственных средств на микробиологическую чистоту стал обязательным, а техника его осуществления постоянно совершенствуется.

В России методология исследования регламентирована Государственной фармакопеей XI изд., вып.2 и двумя ведомостями изменений к ГФ, в которых уточнен ряд позиций, в том числе перечень питательных сред (он расширен). Микробиологи клинических учреждений мало знакомы с ними, а ГФ XI стала раритетом. Вот почему представляется важным привести эти питательные среды в данном разделе.

Следует подчеркнуть, что ГФ является не только официальным, но и обязательным документом. Нарушение требований ГФ по сути делает результат анализа не информативным. Вот почему далее будет приведена рецептура ряда питательных сред, которые хорошо известны. Но коль скоро пропись имеет некоторые непринципиальные особенности, то сочтено необходимым привести ее в таком виде, который дан в ГФ XI. Следует особо подчеркнуть, что подбор питательных сред является результатом специальных исследований, выполненных в нашей стране, по выбору оптимального варианта их рецептур (Крылов Ю.Ф. и др., 1982).

Питательные среды в ГФ помечены под номерами: №№ 1 – 15. Далее они будут представлены с таким же обозначением и в таком же порядке.

**Среда № 1.** Это традиционный питательный агар, посев на который позволяет определить, т.н. общее микробное число. Однако, как читатель легко может убедиться, пропись среды имеет некоторое отличие от наиболее распространенных вариантов коммерческого питательного агара.

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар микробиологический	13,0 г
Мясная вода (1 : 2)	1000 мл
pH 7,3 ± 0,2	

**Среда № 2.** Предназначена для определения количества грибов и представляет собой один из многочисленных вариантов среды Сабуро. Важно выделить pH среды, он составляет 5,6. Остальной состав традиционен.

**Среда № 3.** Селективная накопительная среда для энтеробактерий. Один из вариантов среды, в которой в качестве селекционирующего агента использован малахитовый зеленый. Пропись, предложенная ГФ, несколько отличается от рецептуры сред аналогичного назначения, приведенных в ряде других методических пособий.

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,5 г
Калия фосфат однозамещенный	2,5 г
Глюкоза	10,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Малахитовый зеленый	0,015 г
Мясная вода (1 : 2)	1000 мл
pH 7,3 ± 0,2	

**Среды № 4 и № 5.** Это соответственно агар Эндо сухой и висмутсульфит агар сухой. Госфармакопея не предусматривает каких-либо особенностей в прописи данных питательных сред и предполагает применения их коммерческих серий в соответствии с инструкцией.

**Среда № 6.** Предназначена для определения ферментации глюкозы. Ее пропись:

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	40,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Мясная вода	1000 мл
pH 7,2 ± 0,2	

Т.о. данная среда аналогична обогащенной среде Гисса, принятой за рубежом (см. выше).

**Среда № 7.** Это питательная основа для постановки реакции с реактивом Грисса при определении восстановления нитратов в нитриты.

Пептон ферментативный сухой	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия нитрат	1,5 г
Вода дистиллированная	1000 мл
pH 7,2 ± 0,2	

**Среда № 8.** Для выращивания *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Среда является пептонной водой, обогащенной глюкозой.

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Вода дистиллированная	1000 мл
pH 7,2 ± 0,2	

**Среда № 9.** Плотная среда для *P.aeruginosa*, которая должна способствовать образованию микробом пигмента пиоцианина (дано на литр).

Пептон ферментативный сухой	20,0 г
Магния хлорид безводный	1,4 г
Калия сульфат безводный	10,0 г



Глицерин	10,0 г
Агар-агар микробиологический	15,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

**Среда № 10** предназначена для идентификации *Staphylococcus aureus* по способности ферментировать маннит и давать рост при высокой концентрации хлорида натрия. Для данной цели эти признаки признаны достаточными. Состав среды следующий (на литр воды).

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Маннит	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар-агар	15,0 г

Предложенный перечень питательных сред изначально вошел в ГФ XI. В дальнейшем разработчиками было сочтено необходимым ввести дополнительный перечень тестов, позволяющий более точно выявить энтеробактерии и, в первую очередь, сальмонеллы. Эти дополнения вошли в Изменения № 1 к статье «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» (ГФ XI, вып.2, стр.187). В документе были даны питательные среды №№ 11 – 15. В дальнейшем, в Изменении № 2 к этой же статье ГФ состав сред был уточнен и далее дан в соответствии с прописью, предусмотренной последним Изменением.

**Среда № 11**, лактозный бульон, дан в обычной прописи, без индикатора. Предложен для накопления энтеробактерий.

**Среда № 12** — селенитовая, сухая, накопительная для сальмонелл. Состав ее не оговорен; предусмотрен коммерческий вариант.

**Диагностическая среда № 13**. Один из вариантов трехсахарного агара с солями железа; среда дана в следующей прописи (на литр).

Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептон	20,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Глюкоза	1,0 г
Сульфат железа	0,2 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	0,024 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,3 ± 0,2	

Обращаем внимание микробиологов, изготавливающих среду самостоятельно, что пропись сред № 11 и № 13 в Изменении № 1 и Изменении № 2 различна. Логичность второго варианта рецептур несомненна.

Другая **диагностическая среда № 14** — цитратный агар Симмонса, предложена в традиционной прописи (на литр).

Натрия хлорид	5,0 г
Магния сульфат	0,2 г
Аммония дигидрофосфат	1,0 г
Калия фосфат двузамещенный	1,0 г
Натрия цитрат	3,0 г
Бромтимоловый синий	0,08 г
Агар-агар	20,0
pH 7,2 ± 0,1	

**Среда № 15** — бульон Хоттингера, предусмотрена для определения индола. Способ приготовления ее не оговорен.

ГФ XI требует, чтобы все питательные среды, используемые для анализа микробиологической чистоты лекарственных средств, проходили предварительную проверку на

способность давать рост микроорганизмов, в первую очередь энтеробактерий (*E.coli*, *Salmonella* spp.), а также *S.aureus*, *P.aeruginosa* и грибов.

То. приведенные питательные среды хорошо известны клиническим микробиологам, их часто используют в практике микробиологических лабораторий. Это открывает возможность к широкому контролю микробиологической чистоты лекарств в лабораториях лечебных учреждений (к чему есть достаточные основания).

### **ГЛАВА 13. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ЛЕКАРСТВАХ И БИОСУБСТРАТАХ**

Определение содержания антимикробных препаратов в лекарственных формах и субстанциях, равно как и определение их концентраций в биологических жидкостях и тканях (т.е. изучение фармакокинетики противомикробных веществ) представляют собой две методически сходных ветви аналитической микробиологии. Широкий круг микробиологов мало знаком с ними, хотя их значимость для терапии огромна: в первом случае оценивается качество лекарства, во втором – эффективность и безопасность его дозы.

Микробиологический метод определения содержания антимикробного лекарственного соединения в любом объекте не является единственным. Но только он прост в исполнении, дешев, не требует специального оборудования, а главное — именно микробиологический метод позволяет определить присутствие активной молекулы препарата (а не его фрагмента или метаболита). По мере увеличения роли клинического микробиолога в лечебном процессе необходимость проведения соответствующих исследований будет возрастать.

Метод основан на диффузии антимикробного вещества в засеянную питательную среду из определенного резервуара (лунки, полого цилиндра), вокруг которого после инкубации образуется зона подавления роста. Если процесс зонообразования идет параллельно при диффузии в гель вещества известной (контрольной) концентрации и из изучаемого образца, то сравнение размеров зон подавления роста в том и другом случае с помощью специального метода обмера позволяет определить содержание антибиотика в анализируемом объекте.

Образование зоны подавления роста тест-микроба процесс сложный, зависящий от ряда факторов: диффузионной способности антимикробного соединения, его стабильности в питательной среде, наличия сопутствующих веществ, роста культуры, ее чувствительности к антимикробному препарату и мн.др. Совершенно очевидно, что решающим компонентом анализа является питательная среда, ее характеристики и качество. Именно она обеспечивает и образование «газона», и диффузию антибиотика в гель. Только при наличии своего рода баланса между тем и другим достигается информативность образующихся зон подавления роста микроба.

Универсальной среды для определения концентрации антимикробных соединений не существует (как и нет единой тест-культуры). Для каждой группы антибиотиков предложена своя питательная среда или несколько сред (последнее чаще).

Питательные среды подобного назначения должны быть просты по составу, поскольку любые дополнительные компоненты могут препятствовать диффузии антимикробного препарата в гель. рН среды должен быть строго выверен; этот показатель является очень важным элементом качественного проведения анализа.

Микробиолог, определяющий концентрацию антибиотика в каком-либо субстрате, может столкнуться с парадоксальным фактом: смена серии агара, мясного или других малостандартизуемых компонентов питательной среды приводит к полному или частичному прекращению зонообразования. В других случаях зоны становятся не только малыми (по величине диаметра), но не четкими, трудночитаемыми или двойными, террасовидными. Поэтому при внутривлабораторном изготовлении питательной среды целесообразно пользоваться одними и теми же сериями элементов рецептуры. В противном случае не исключено, что средовар вынужден будет «перебирать» компоненты среды, пока конечный продукт (питательная среда) не обеспечит образование четких, достаточного размера зон подавления роста тест-микроба. Когда это возможно, приготовлением питательной среды для определения концентрации антибиотических веществ должны заниматься специалисты, имеющие соответствующий опыт и работающие вместе с микробиологами-аналитиками, способными обеспечить надлежащий контроль подобных питательных сред. Это тоже достаточно сложный вопрос.

По существующим формальным требованиям состав питательных сред, используемых при контроле лекарств, должен строго соответствовать Государственной фармакопее XI издания, вып.2. Приведем некоторые из них.

**Среда для определения бензилпенициллина, ампициллина, оксациллина.** Тест-микроб *Staphylococcus aureus* 209 P.

Гидролизат мяса по Хоттингеру (130 – 140 мг% аминного азота)	1000 мл
Глюкоза	1,0 г
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	10,0 – 12,0 г
pH 6,8 – 7,0	

Несколько замечаний как к данной прописи, так и тем, что приведены ниже. В ГФ XI, вып.2 в качестве основного источника азота назван ферментативный гидролизат биомассы микроорганизмов без оболочек (5 г/л). Здесь и далее он не упоминается, поскольку широкого применения в настоящее время он не имеет. Вместо него приведен жидкий мясной гидролизат с определенной характеристикой по аминному азоту. Взамен жидкого гидролизата мяса по Хоттингеру можно использовать выпускаемый сухой продукт. Для получения необходимого количественного показателя аминного азота на литр требуется 13 – 18 г сухого гидролизата. Следует также обратить внимание на то, что глюкозу необходимо вводить в среду непосредственно перед ее использованием.

**Среда для определения цефалексина и цефалотина** имеет ту же пропись, но она используется с другой тест-культурой: *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

**Среда для эритромицина и олеандомицина;** тест-микроб *Bacillus cereus* var.*mycoides* HB.

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30 – 35 мг% аминного азота)	1000 мл
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,8 – 8,0	

Жидкий гидролизат мяса по Хоттингеру может быть приготовлен, используя 3,5 – 5,0 г на литр гидролизата мяса, выпускаемого промышленностью. Хотя по ГФ XI приведенная выше среда не предусмотрена для исследования других макролидов, она была успешно использована авторами при изучении фармакокинетики кларитромицина и азитромицина.

**Среда для изучения антибиотиков тетрациклиновой группы.**

Тест-культура *Bacillus subtilis* var. L<sub>2</sub>

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30 – 35 мг% аминного азота)	1000 мл
Глюкоза	10,0 г
Агар-агар	10,0 – 15,0 г
pH 6,8 – 7,0	

Данная среда пригодна для исследования тетрациклина, доксициклина, окситетрациклина, метациклина.

Глюкоза добавляется в расплавленную среду непосредственно перед приготовлением чашек.

**Среда для работы с гентамицином и стрептомицином.** Тест-культуры рекомендуемые ГФ XI различны: для гентамицина *Bacillus pumilus* NCTC 8241, для стрептомицина *Bacillus cereus* var.*mycoides* 537. Пропись среды для гентамицина.

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30 – 35 мг% аминного азота)	1000 мл
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,8 – 8,0	

Среда для канамицина отличается от предшествующей более насыщенным гидролизатом Хоттингера (130 – 140 мг% аминного азота), меньшим количеством агар-агара — 10,0 – 12,0 г.

Тест-культура та же, что для анализа гентамицина. Имеется опыт применения этой же среды со спорами *Bacillus subtilis* ATCC 6633, причем исследователи считают, что зоны с этой культурой более четко очерчены.

**Среда для работы с противогрибными препаратами:** амфотерицином В, нистатином, леворином. Она же была (вне ГФ XI) использована при изучении фармакокинетики некоторых имидазольных производных. В прописи этой среды отсутствуют нестандартизируемые компоненты. Она первая успешная попытка создания «синтетической» среды с помощью солей, официально внедренная в практику. Однако малостандартизуемый агар-агар оставлен как желирующий компонент. В качестве основного источника азота использована аммонийная соль. Тест-культура *Candida utilis* ЛИА-01. Дано на литр.

Аммония цитрат, двузамещенный	5,0 г
Калия хлорид	20,0 г
Натрия хлорид	20,0 г
Динатрия гидрофосфат	5,0 г
Глюкоза	10,0 г
Агар-агар	18,0 г
pH 5,8 – 6,0	

Количество глюкозы может быть уменьшено в зависимости от интенсивности роста тест-культуры. При изучении фармакокинетики необходимо проверить возможность зонообразования в результате действия нативной крови (бактерицидность крови). Подобный эффект вероятен при использовании «голодных» сред. Поэтому проверка антимикробного действия неразведенной крови до введения больному лекарства может быть весьма информативна и полезна. Кровь, взятая в разведении, подобным действием не обладает.

В фармакопею вошла еще одна «синтетическая» среда для определения концентрации антибиотика гелиомицина. В ней использован хлорид аммония. Опубликованы прописи «синтетических» сред для работы с аминогликозидами, тетрациклинами, макролидами, в которых источником азота также являются различные соли аммония.

В мировой практике существует значительное число питательных сред, используемых при исследовании содержания антибиотиков в лекарствах и субстратах различной природы, включая пищевые продукты. Для определения концентраций бензилпенициллина и бацитрацина предложена т.н. «среда № 2» следующего состава:

Панкреатический перевар желатина	6,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Мясной экстракт	1,5 г
Агар-агар	15,0 г
pH 6,6 ± 0,1	

Для исследования стрептомицина и других аминогликозидов используется «среда № 5».

Агар-агар	15,0 г
Панкреатический перевар желатина	6,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Мясной экстракт	1,5 г
pH 7,9 ± 0,1	

Для работы с карбенициллином и полимиксином рекомендована следующая пропись среды (на литр).

Панкреатический перевар казеина	17,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Папаиновый перевар соевой муки	3,0 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Агар-агар	20,0 г
pH 7,2 ± 0,1	

**Противогрибные препараты** предложено исследовать на «среде № 21».

Глюкоза	11,0 г
Панкреатический перевар желатина	5,0 г
Дикалия гидрофосфат	3,68 г
Калия дигидрофосфат	1,32 г
Натрия хлорид	3,5 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г
Мясной экстракт	1,5 г
Агар-агар	15,0 г
pH 6,6 ± 0,2	

Перечень прописей может быть продолжен. Однако очевиден принцип конструирования подобных питательных сред, уже упомянутый выше: они должны обеспечить рост тест-культур (в этом отношении все приведенные рецептуры безупречны) и диффузию антибиотика в гель. Последнее зависит от качества отдельных компонентов среды, в каждом случае она требует проверки и, достаточно часто, корректировки состава, количественной и качественной.

## ГЛАВА 14. . НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Данная глава призвана на частных примерах отразить все разнообразие питательных сред для отдельных групп микроорганизмов. Кроме того, приведенные прописи знакомят микробиологов с отдельными питательными средами, на которые обращено внимание в зарубежной практике. Безусловно, некоторые из сред имеют большой практический смысл. Они логичны и информативны. Если учесть, что состав сред в большинстве случаев не представляет собой что-либо сложное, есть основание для их апробации и последующего возможного внедрения в повседневную деятельность отечественных медицинских микробиологических служб.

### Питательные среды для энтерококков

Энтерококки дают рост на многих питательных средах, особенно обогащенных: мясо-пептонный агар с добавлением крови и глюкозы, сердечно-мозговая среда с добавлением крови, триптиказо-соевый агар с кровью и т.д. Многие из перечисленных в соответствующем разделе сред для облигатно анаэробных бактерий обеспечивают интенсивный рост энтерококков. Отдельного обсуждения заслуживают селективные питательные среды, обеспечивающие преимущественный рост этих микроорганизмов. Такие среды, кроме того, часто выполняют диагностическую функцию. Энтерококки, в том числе играющие основную роль в происхождении заболеваний человека — *E. faecalis* и *E. faecium*, отличаются толерантностью к действию целого ряда селективных веществ, среди которых многие антибиотики и др. противомикробные средства, желчь и ее соли, натрия хлорид в больших концентрациях, некоторые химические соединения.

Следует, однако, обратить внимание на то, что селекционирующее действие названных веществ не распространяется на некоторые другие микроорганизмы, в том числе и в первую очередь стрептококки группы D. Поэтому дифференциация этих бактерий остается необходимой.

Большая группа питательных сред основана на селекционирующем действии азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ). Наиболее простая пропись т.н. «подтверждающего агара», часто используемого в санитарной микробиологии, включает (на литр).

Глюкоза	5,0 г
Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия азид	0,4 г
Метиленовый синий	0,01 г
Агар-агар	15,0 г
pH 8,0 ± 0,2	

Плотные и жидкие варианты этой питательной среды могут содержать другие селективные агенты и их сочетания: антибиотики (налидиксовая кислота, гентамицин, полимиксин), соли

желчи, теллурида калия, 6,5% хлорида натрия. Например, один из бульонов для энтерококков имеет следующий состав (на литр).

Натрия хлорид	65,0 г
Глюкоза	5,0 г
Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия азид	0,4 г
Метиленовый голубой	0,01 г
pH 8,0 ± 0,2	

Селекция происходит за счет высокого содержания хлорида натрия и азидата натрия.

По ряду зарубежных публикаций при выделении энтерококков определенное признание получил желчно-эскулиновый агар с азидом натрия. Его состав на литр.

Панкреатический перевар казеина	17,0 г
Пептон	5,0
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	11,0 г
Железа аммонийного цитрат	0,5 г
Эскулин	1,0 г
Натрия азид	0,15 г
Агар-агар	15,0 г
pH 8,2 ± 0,2	

Колонии энтерококков и стрептококков группы D имеют темно-коричневую окраску и вокруг них цвет среды меняется до черного или темно-коричневого.

На среде с теллуридом калия *Enterococcus faecalis* дает черные колонии. Один из вариантов среды имеет следующую пропись (на литр).

Мясной экстракт	10,0 г
Пептон	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия теллурид	0,5 г
Агар-агар	15,0 г
Кровь дефибринированная	50,0 мл
pH 6,2 ± 0,2	

Для выделения энтерококков, в первую очередь из кишечного содержимого, рекомендован SNA агар, в который в качестве селективных агентов введены антибиотики. Среду используют как с добавлением 5% крови, так и без нее. Состав ее на литр следующий.

Панкреатической перевар казеина	12,0 г
Пептон	5,0 г
Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Крахмал	1,0 г
Налидиксовая кислота	0,015 г
Колистин (полимиксин В)	0,01 г
Агар-агар	14,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Среда не является строго селективной для энтерококков, поскольку налидиксовая кислота и колистин ингибируют рост только грамотрицательных бактерий.

### Питательные среды для стафилококков

Среди возбудителей заболеваний человека стафилококки могут быть условно отнесены к микроорганизмам с относительно не очень высокими ростовыми потребностями. Достаточно эффективно могут быть использованы т.н. среды общего назначения: мясо-пептонный агар, мясо-

пептонный бульон, среды на основе перевара Хоттингера, триптиказо-соевые агар и бульон и др. Тем не менее в микробиологической литературе присутствует несколько десятков целевых питательных сред для стафилококков. Все они, в основном, решают задачу селективного выделения этих микроорганизмов, в том числе и отдельных видов, а также установления их дифференциально-диагностических признаков.

В нашей стране прочные позиции занимает желточно-солевой агар Г.Н.Чистовича, выполняющий и селективные, и диагностические функции.

Мясо-пептонный агар	1000,0 мл
Натрия хлорид	100,0 г
Взвесь желтка	200,0 мл
pH 7,2 ± 0,2	

Взвесь желтка готовят в изотоническом растворе хлорида натрия (1 желток на 150 – 200 мл).

На среде Г.Н.Чистовича стафилококки дают рост через 48 часов инкубации, в то время как подавляющее большинство других микроорганизмов, которые присутствуют в биосубстратах, на среде с таким содержанием натрия хлорида колоний не образуют. Радужный венчик или зона мутности вокруг колоний (положительная лецитиназная реакция) свидетельствуют о принадлежности культуры к *S.aureus* и о вероятной патогенности данной культуры (последнее признается не всеми).

На данном принципе основана рецептура многих питательных сред, используемых в микробиологии. Рядом фирм выпускается солевой агар или солевой агар с маннитом, ферментация которого трактуется как принадлежность культуры к *S.aureus*. Дано на литр.

Маннит (D)	10,0 г
Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Пептон	5,0 г
Мясной экстракт	1,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар-агар	16,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Утилизация маннита приводит к окраске среды в желтый цвет. Селекцию обеспечивает высокое содержание (7,5%) хлорида натрия.

Среди достаточно часто упоминаемых в зарубежной литературе питательных сред для выделения и количественной оценки стафилококков прежде всего следует назвать среду Baird-Parker, имеющую несколько прописей. Одна из них (на литр).

Мясной экстракт	5,0 г
Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Глицин	12,0 г
Дрожжевой экстракт	1,0 г
Лития хлорид	5,0 г
Натрия пируват	10,0 г
Агар-агар	17,0 г
pH 7,0 ± 0,2	

Данная пропись рассматривается или как самостоятельно используемая среда, или как основа для питательной среды более сложного состава. В частности, таковой является среда ETGPA (Egg Tellurite Glycine Pyruvate Agar), в которой дополнительно присутствуют в качестве селективного агента теллурид калия (1,0 г/литр) и эмульсия яичного желтка (50 мл/литр). Эмульсию готовят, смешивая содержимое одного яйца (целиком) с еще одним яичным желтком (или двух яиц с двумя желтками и т.д.). Золотистый стафилококк образует на среде черные или темно-серые колонии, окруженные зоной просветления среды.

Другой вариант добавки к среде Baird-Parker, т.н. RPF добавка, включает фибриноген крови КРС (3,75 г/л), ингибитор трипсина (0,025 г/л), кроличью плазму (25,0 мл) и теллурид калия в небольшом количестве (всего 0,025 г/л). Это добавка позволяет проследить реакцию

плазмокоагуляции вокруг колоний золотистого стафилококка. Она проявляется в виде непрозрачной зоны уплотнения среды вокруг колоний.

С другой стороны, для выделения золотистого стафилококка из продуктов питания предложена жидкая среда Gioliotti-Cantoni, которая близка по составу к среде Baird-Parker (без агар-агара), но с содержанием теллурита калия 3,5 г/л. Среда рассматривается как накопительная для золотистого стафилококка.

Еще одной средой, сочетающей селективные свойства солей лития и теллурита и диагностический потенциал ферментации маннита золотистым стафилококком, является агар Vogel-Johnson. Состав (на литр).

Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Глицин	10,0 г
D-маннит	10,0 г
Дикалия гидрофосфат	5,0 г
Лития хлорид	5,0 г
Калия теллурит	1,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Среди питательных сред, рекомендованных для выделения и культивирования стафилококков в США, агар Schleifer-Kramer (SK-агар), чье селективное действие определяется хлоридом лития и азидом натрия. Состав среды (на литр).

Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Глицерин	10,0 г
Натрия пируват	10,0 г
Калия изотиоционат	2,0 г
Лития хлорид	2,0 г
Натрия азид	0,045 г
Динатрия гидрофосфат	0,9 г
Натрия дигидрофосфат	0,6 г
Глицин	0,5 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Азид натрия вносят в расплавленную и охлажденную до 50°C среду перед разлитием в чашки Петри.

Следует упомянуть также, что при выделении стафилококков могут быть использованы антибиотики, не активные в отношении этой группы микроорганизмов. Среди апробированных полимиксины, налидиксовая кислота, противогрибные препараты.

### **Питательные среды для листерий**

Питательные среды играют ключевую роль в выделении листерий. Кроме того, они во многом решают проблему диагностики этих микроорганизмов. Существуют две схемы выделения листерий. Одну из них принято обозначать как метод Министерства сельского хозяйства США (USDA-method) другую — как метод Инспекции пищевых продуктов Нидерландов (NGFIS-method). Практически все питательные среды, вошедшие в эти схемы, приведены в отечественных инструкциях.

Оба варианта метода (USDA и NGFIS) включают три этапа: накопление, выделение, идентификация. И во всех случаях центральное место занимают питательные среды. Они представлены далее (без указания последовательности всех этапов исследований — это отдельная тема).

По методу USDA накопление ведут в UVM бульоне обогащения. Он включает (на литр).



Натрия хлорид	20,0 г
Динатрия гидрофосфат	9,6 г
Калия дигидрофосфат	1,35 г
Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Пептон	5,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Эскулин	1,0 г
Налидиксовая кислота	0,04 г
Акрифлавин солянокислый	0,012 г
pH 7,2 ± 0,2	

После инкубации в течение суток делают посев со среды накопления на плотную питательную среду, в качестве которой может быть модифицированный Оксфордский агар или LPM-агар.

Пропись первого включает (на литр).

Пептон на основе мяса говяжьего	23,0 г
Кукурузный крахмал	1,0 г
Лития хлорид	15,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Эскулин	1,0 г
Железа цитрат аммонийный	0,5 г
Агар-агар	12,0 г
Ингибирующая добавка	10,0 мл
pH 7,0 ± ,02	

Ингибирующая добавка (кроме лития) имеет несколько прописей (на 10 мл):

Циклогексимид	0,4 г
Колистина сульфат	0,02 г
Фосфомицин	0,01 г
Акрифлавин	0,005 г
Цефотетан	0,002 г

Другой ее вариант:

Моксалактам	0,015 г
Колистина сульфат	0,01 г

Пропись добавок, предложенная за рубежом, не всегда доступна для отечественной практики, однако, очевидно, что некоторые антибиотические компоненты могут быть заменены (фосфомицин, моксалактам, цефотетан) без ущерба для селекционирующего действия.

Колонии *L.monocytogenes* на Оксфорд агаре, имеют черный цвет и окружены черной каймой.

Схема исследования NGFIS предлагает использовать в качестве среды обогащения бульон PALCAM с последующим высевом на агар PALCAM (дано на литр).

Пептон	3,0 г
Лития хлорид	5,0 г
Маннит	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Крахмал	1,0 г
Эскулин	0,8 г
Железа цитрат аммонийный	0,5 г
Глюкоза	0,5 г
Феноловый красный	0,08 г
Цефтазидим	0,02 г
Полимиксин В	0,01 г
Акрифлавина гидрохлорид	0,005 г

Агар-агар	10,0 г
Эмульсия яичного желтка	25,0 г
pH 7,02± 0,2	

Эмульсию яичного желтка готовят, смешивая 11 желтков и полное содержимое одного яйца.

Т.о. одна и та же среда, отличающаяся по содержанию агара, выполняет функции обогащения культуры, подавления роста сопутствующей флоры (соль лития, акрифлавин, антибиотики) и диагностики по гидролизу эскулина и образованию лецитиназы. На PALCAM агаре колонии листерий имеют черный центр и такой же ореол.

Близка по составу к жидким вариантам сред (UVM бульон, PALCAM бульон) накопительная среда Фразера (Fraser broth), имеющая следующий состав (на литр).

Натрия хлорид	20,0 г
Динатрия гидрофосфат	12,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Пептон	5,0 г
Панкреатический перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Лития хлорид	3,0 г
Калия дигидрофосфат	1,35 г
Эскулин	1,0 г
Добавка Фразера	10,0 мл
pH 7,2 ± 0,2	

Добавка включает:

Железа цитрат аммонийный	0,5 г
Акрифлавина гидрохлорид	0,25 г
Налидиксовая кислота	0,1 г
Спирт этиловый	5,0 мл
Вода дистиллированная	5,0 мл

Листерии дают рост на многих обогащенных питательных средах, в том числе на 5% кровяном агаре с 1% глюкозы, в триптиказо-соевом бульоне с дрожжевым экстрактом, а также на средах с углеводами для определения ферментации глюкозы, салицина, рамнозы, дульцита, раффинозы. Состав последних (на литр).

Пептон	10,0 г
Мясной экстракт	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	0,1 г
Углевод	5,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

### Питательные среды для кампилобактерий

Значительная часть питательных сред для выделения кампилобактерий имеет в своей основе известные композиции с добавлением селективных компонентов, прежде всего антибиотиков. Согласно утвержденной МЗ СССР (1989 г.) инструкции по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза за основу рекомендовано брать эритрит агар со следующими добавками на литр.

Эритрит-агар сухой	36,0 г
Экстракт кормовых дрожжей	4,0 г
Железо сернокислое закисное	0,04 – 0,15 г
Лизированная кровь (баранья, лошадиная)	70,0 мл
Антибиотическая смесь (см.ниже)	

Лизированная кровь животных может быть заменена на 100 мл цельной бараньей крови или 50 мл лизированной крови человека (донорской). В этой же инструкции предложены следующие смеси антибиотиков (дано на литр среды).

**Смесь № 1**

Рифампицин	20,0 мг
Фузидин	10,0 мг
Амфотерицин В	3,0 мг
Цефалотин	15,0 мг

**Смесь № 2**

Полимиксин В	2,0 мг
Рифампицин	10,0 мг
Амфотерицин В	3,0 мг
Ристомицин	10,0 мг

Последний в настоящее время выпускается только за рубежом, как реактив.

По аналогичному принципу «сконструированы» многие другие питательные среды для выделения и культивирования кампилобактерий. В отечественной и зарубежной литературе названы, как эффективные, среда Скирроу, «старая» и «новая» среда Бутцлера, среда на основе агара для бруцелл, среда Престон, среда Блейзера, содержащая и не содержащая кровь, т.н. селективная среда для кампилобактерий, среда FDA для кампилобактерий (среда M29) и нек.др. Исторически одна из первых среда Скирроу имеет следующий состав (на литр).

Пептон	15,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Перевар печени	2,5 г
Ванкомицин	0,01 г
Триметоприм	0,005 г
Полимиксин В	2500 ЕД
Агар-агар	12,0 г
рН 7,4 ± 0,2	

Как в среде Скирроу, так и в некоторых других (среда M29, один из вариантов «старой» среды Бутцлера, среда Престон) в качестве селективного агента использован триметоприм. Это спорное предложение, поскольку в биологических субстратах могут присутствовать естественные ингибиторы этого соединения (в частности, тимин и тимидин). В «новой» среде Бутцлера это учтено заменой всех компонентов, обладающих селекционирующим действием. В основе этой питательной среды лежит агар для культивирования бруцелл. В целом, одна из рецептур имеет следующие компоненты (на литр).

Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Пептон	5,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Циклогексепид	0,05 г
Цефазолин	0,015 г
Новобиоцин	0,005 г
Бацитрацин	25000ЕД
Полимиксин В	10.000 ЕД
Агар-агар	15,0 г
рН 7,4 ± 0,2	

В среду для улучшения роста кампилобактерий может быть добавлена дефибрированная кровь (5%). В некоторых приведенных в литературе вариантах среды Бутцлера в качестве добавок, влияющих на рост микроба, приведены сернокислое железо (0,25 г/л), натрия пируват (0,25 г/л), натрия метабисульфит (0,25 г/л).

Определенное признание в качестве селективного агента получил цефалоспорин 3 поколения цефоперазон. Это антибиотик широкого противобактериального спектра действия. Он

доступен для отечественной практики и, в количествах, достаточных для питательных сред, экономически целесообразен. Поскольку противогрибным действием цефоперазон не обладает, его рекомендовано использовать вместе с амфотерицином В. Состав одной из таких питательных сред (селективный агар для кампилобактерий без крови) включает (на литр):

Мясной экстракт	10,0 г
Пептон	10,0 г
Древесный активированный уголь	4,0 г
Гидролизат казеина	3,0 г
Натрия пируват	0,25 г
Железо сернокислое	0,25 г
Натрия дезоксихолат	1,2 г
Цефоперазон	0,035 г
Амфотерицин В	0,01 г
Агар-агар	12,0 г

pH 7,4 ± 0,2

Антибиотики вводят в расплавленную питательную среду при 50°C непосредственно перед приготовлением чашек.

В одном из отечественных руководств (Н.А.Чайка и др. 1988 г.) эти препараты рекомендовано использовать в следующем сочетании (на литр).

Цефоперазон	0,03 г
Рифампицин	0,01 г
Амфотерицин	0,002 г

С учетом относительно низкой активности цефоперазона и высокой рифампицина в отношении грамположительных кокков такое расширение селекционирующего действия представляется оправданным.

Для выделения *Campylobacter fetus* рекомендован ряд питательных сред несколько иного состава. В качестве селективных агентов предложено использовать (помимо некоторых упомянутых выше) новобиоцин и бацитрацин. Но, что более важно, обращено внимание на необходимость поддержания адекватного редокс-потенциала среды. Одна из рецептур выглядит следующим образом (дано на литр).

Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
L-цистин	0,5 г
Натрия тиогликолят	0,5 г
Циклогексепид	0,05 г
Новобиоцин	0,005 г
Бацитрацин	25000ЕД
Полимиксин В	10000ЕД
Резазурин	0,001 г
Агар-агар	15,0 г
Кровь баранья	150,0 мл

pH 7,2 ± 0,2

Кровь и антибиотики вносят в охлажденную до 50°C среду непосредственно перед приготовлением чашек.

### **Питательные среды для неферментирующих бактерий**

Аэробные неферментирующие грамотрицательные бактерии представляют собой по номенклатуре несколько условную группу возбудителей инфекционной патологии человека. Наиболее часто называют роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* и нек.др. Разнообразие признаков, которые используют для дифференциации бактерий, не ферментирующих сахара, нашло свое отражение и в составе питательных сред, предназначенных для выделения и

первичной диагностики этих микроорганизмов. Естественно, что наибольшее внимание привлекает палочка сине-зеленого гноя, *Pseudomonas aeruginosa*, которая во второй половине прошлого века заняла очень важное место в этиологии гнойно-септических заболеваний. Сравнительно нетребовательный микроорганизм, *P. aeruginosa*, дает рост на многих традиционных питательных средах, как и другие неферментирующие грамотрицательные палочки. Большинство специальных питательных сред способствует выявлению микроба, в первую очередь благодаря пигментообразованию, которое напрямую зависит от состава среды и условий культивирования. Одна из композиций включает (на литр).

Глицерин	10,0 г
Магний сернокислый	1,5 г
Пептон ферментативный	12,0 г
Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,4 г
Агар-агар	14,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Первые два компонента прописи являются стимуляторами пигментообразования, в т.ч. пиоционина. Предложен ряд других сред, близких по составу к приведенной выше и имеющих то же целевое назначение, а также сред, сочетающих селекционирующее действие и диагностический потенциал. Одна из них (дано на литр):

Мясной экстракт	6,0 г
Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Сахароза	90,0 г
Натрия хлорид	14,0 г
Магний сернокислый	2,5 г
Глюкоза	5,0 г
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Лошадиная сыворотка инактивированная	100,0 мл
Бензилпенициллин	500000 ЕД
pH 7,4 ± 2	

Инактивируют лошадиную сыворотку прогреванием в водяной бане в течение 30 минут при 56°C.

Сыворотку и антибиотик добавляют в среду стерильно перед ее разлитием в чашки Петри или пробирки.

Одной из наиболее рекомендованных в зарубежной практике является среда с поверхностно активным веществом цетримидом (*Cetrimid agar*). Цетримид обладает селекционирующим действием, подавляя рост большого круга микроорганизмов, но не *P. aeruginosa*. Кроме того и он, и некоторые другие компоненты питательной среды стимулируют пигментообразование. Одна из прописей среды с цетримидом, вошедшая в USP (Фармакопею США), включает (на литр).

Панкреатический перевар желатина	20,0 г
Калий сернокислый	10,0 г
Магния хлорид	1,5 г
Цетримид	0,3 г
Глицерин	10,0 мл
Агар-агар	14,0 г
pH 7,2 ± 0,2	

Перевар желатина может быть заменен на мясной экстракт, пептон или иной источник азота (в т.ч. в сочетании).

Дифференцирующие свойства среды более демонстративны при включении в нее помимо цетримидом и др. приведенных выше компонентов ацетамида. Культуры, дезаминирующие ацетамид, меняют ее окраску. Одна из таких сред (на литр).

Калий сернокислый	10,0 г
Магния хлорид	1,5 г

D-маннит	5,0 г
Пептон	0,2 г
Цетримид	0,3 г
Ацетамид	10,0 г
Глицерин	5,0 мл
Феноловый красный	0,012 г
Агар-агар	14,0 г
pH 7,0 ± 0,2	

Особенности метаболизма *P.aeruginosa* позволили предложить достаточно нестандартную прописку селективной среды для выделения и культивирования микроба (дано на литр).

Калия дигидрофосфат	1,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,0 г
Аммоний азотнокислый	1,0 г
Магний сернокислый	0,2 г
Кальция хлорид	0,02 г
Железа хлорид	0,05 г
Керосин очищенный	20,0 мл
pH 6,9 – 7,0	

Компоненты питательной среды, кроме керосина, растворяют, разливают в пробирки или флаконы, автоклавируют, наслаивают керосин по 0,2 мл на пробирку или 1 – 2 мл на флакон.

Для селективного выделения и культивирования *Pseudomonas* spp. могут быть использованы среды, включающие солевые компоненты и, в качестве источника углерода, какой-либо сахар, например, глюкозу. Состав одной из них на литр.

Калия дигидрофосфат	3,8 г
Дикалия гидрофосфат	12,6 г
Аммоний сернокислый	1,1 г
Магний сернокислый	0,15 г
Глюкоза	15,0 г
Цинк сернокислый	0,175 г
Кобальт сернокислый	0,1 г
Медь сернокислая	0,008 г
Марганец сернокислый	0,008 г
Квасцы железоаммонийные	0,1 г
pH 7,2 ± 0,2	

Приведенные выше прописки представляют собой лишь небольшую часть тех питательных сред, которые рекомендованы для работы с *P.aeruginosa*. Однако остальные рецептуры не представляют собой что-либо принципиально иное. В основном, все они учитывают относительную нетребовательность микроба и его способность к пигментообразованию.

В целом такая же схема конструирования питательных сред предложена для ацинетобактеров (естественно, без продукции пигмента): селективность среды определяется способностью микроба утилизировать простейшие или нетрадиционные источники питания. Например, для культивирования *A.lwoffii* предложена среда следующего состава (на литр).

Аммоний сернокислый	4,0 г
Глютамин	10,0 г
Дикалия гидрофосфат	1,9 г
Калия дигидрофосфат	0,57 г
Магний сернокислый	0,2 г
Железа хлорид	0,6 г
Марганца хлорид	0,6 г
Цинка хлорид	0,6 г
Кальция хлорид	0,6 г
Натрия хлорид	0,6 г
Медь сернокислая	0,6 г
pH 7,2 ± 0,2	

Для роста *A.baumannii* рекомендована среда близкая по составу к среде с керосином (дано на литр).

Аммоний сернокислый	1,0 г
Дикалия гидрофосфат	4,5 г
Магний сернокислый	0,2 г
Натрия хлорид	0,1 г
Кальция хлорид	0,1 г
Железа хлорид	0,02 г
Нефть неочищенная	50,0 мл
pH 7,2 ± 0,3	

Нефть стерилизуют фильтрованием, добавляют в готовую, стерильную питательную среду и тщательно перемешивают. После этого ее разливают в стерильную посуду (пробирки, колбы и т.д.).

Дифференциально-диагностические среды для бактерий рода *Acinetobacter* основаны на отсутствии гидролиза сахаров (лактозы, мальтозы). В частности, для дифференциации микроорганизмов, дающих рост при посеве мазков (отделяемого) из мочевого тракта, предложена среда следующего состава (на литр).

Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Перевар соевой муки	5,0 г
Мальтоза	10,0 г
Лактоза	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	1,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	0,02 г
pH 6,8 ± 0,2	

Колонии, имеющие окраску близкую к цвету среды, рассматривают как потенциально относящиеся к неферментирующим бактериям, чаще ацинетобактерам.

Бактерии рода *Alcaligenes* утилизируют ацетамид (см.выше), а также циклогексанкарбоновую кислоту (в ряде справочников ее упоминают как гексагидробензойную кислоту), что типично для узкого круга микроорганизмов, в т.ч. *A.faecalis*. Состав этой среды (на литр).

Циклогексанкарбоновая кислота	2,0 г
Дикалия гидрофосфат	3,5 г
Калия дигидрофосфат	1,5 г
Аммоний азотнокислый	1,0 г
Дрожжевой экстракт	0,1 г
Магний сернокислый	0,5 г
Кальция хлорид	0,01 г
Железа хлорид	0,01 г
Цинк сернокислый	0,01 г
pH 7,0 ± 0,2	

Среду близкого состава (CHCA среду) рекомендовано использовать для роста артробактерий. Поэтому среды с циклогексанкарбоновой кислотой не исключают необходимость установления принадлежности микроорганизма, давшего рост.

Также, как для других неферментирующих бактерий, предложены синтетические среды для культивирования *A.faecalis*. Аммонийная соль в этом случае является источником азота, натрия сукцинат-углерода (дано на литр).

Натрия сукцинат	5,0 г
Аммония хлорид	0,7 г
Калия дигидрофосфат	0,75 г
Дикалия гидрофосфат	0,61 г
Магний сернокислый	0,2 г
Кальция хлорид	0,03 г
Марганца хлорид	0,003 г
Железа хлорид	0,0024 г

Натрий молибденовокислый 0,001 г  
рН 7.0 ± 0,2

### Рекомендуемая литература

- Герхард Ф.(ред). Методы общей микробиологии. М., 1984, тт.1 – 3.
- Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М., 1982.
- Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии. М., 1952.
- Кочеровец В.И., Михайлова В.С. и др. Методы микробиологического анализа неспорообразующих анаэробных бактерий. М., 1996.
- Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. М., 1990.
- Шлегель Г. Общая микробиология. М., 1987.
- Государственная фармакопея. XI издание, вып.2. М., 1990.
- Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. МЗ СССР, 1984.
- МУК. Лабораторная диагностика сальмонеллез человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды. МЗ СССР, 1990.
- МУК. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. МЗ РФ, 2001.
- Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. МЗ СССР, 1989.
- Atlas R. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1997.
- Isenberg H.(Ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook, v.1. ASM Press, 1995.
- Larone D. Medicall Important Fungi. ASM Press, 2002.
- Shapin R., P.Murray. Media. In Manual of Clinical Microbiology, 7<sup>th</sup> Ed. ASM Press, 1999, 1687 – 1707.
- Vandepitte J.et al. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. WHO, 1991.