

ВСЕСОЮЗНАЯ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ТРУДОВОГО
КРАСНОГО ЗНАМЕНИ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
НАУК имени В. И. ЛЕНИНА

ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я. Р. КОВАЛЕНКО

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по изготовлению и использованию питательных сред
и растворов для микробиологических целей, культивирования
клеток и вирусов

ВСЕСОЮЗНАЯ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО
ЗНАМЕНИ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ИМЕНИ В.И.ЛЕНИНА

ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМ.Я.Р.КОВАЛЕНКО

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по изготовлению и использованию питательных
сред и растворов для микробиологических целей,
культивирования клеток и вирусов

Москва - 1986

Методические рекомендации подготовили сотрудники лаборатории технологии клеточных культур и питательных сред Всесоюзного ордена Ленина научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им.Я.Р.Коваленко: зав.лабораторией, профессор Л.П.Дьяконов, ст.н.сотр. А.Ф.Конюхов, канд.вет.наук Е.Н.Василевич, ст.ветврач-бактериолог Д.И.Костина, аспирант О.Ш.Расулев, ст.н.сотр. Всесоюзного научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности Госагропрома СССР (ВНИИТИБП) канд.биол.наук Л.А.Коротеева.

Методические рекомендации предназначены для использования в работе НИВИ, НИВС и ветеринарно-диагностических лабораторий. Утверждены секцией "Биология, иммунология и биотехнология в ветеринарии" Отделения ветеринарии ВАСХНИИ, протокол № 2 от 14.V.86 г.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

	стр.
I. 1. Назначение и цели применения питательных сред	3
2. Принципы питания микроорганизмов	3
3. Разделение микроорганизмов на группы по типам питания	4
4. Подбор состава бактериологических питательных сред	8
5. Определение потребностей питания	8
6. Стабильность среды	12
7. Техника изготовления питательных сред	15
II. Приготовление полуфабрикатов питательных сред	16
1. Мясная вода	16
2. Пептон Мартена	18
3. Мясной перевар по Хоттингеру	20
4. Печеночный экстракт	23
5. Сердечный экстракт	24
6. Дрожжевой экстракт	24
7. Определение триптофана	24
III. Основные и специальные бактериологические питательные среды - расчеты и методы их приготовления	26
I. Основные питательные среды	26
2. Питательные среды для изучения метаболизма микроорганиз- мов	30
3. Питательные среды для культивирования коли-паратифозной группы бактерий	33
4. Питательные среды для культивирования кампилобактерий	37
5. Питательные среды для культивирования бруцелл	39
6. Питательные среды для культивирования микобактерий	41
7. Питательные среды для культивирования микоплазм	46
8. Питательные среды для культивирования грибов	49
9. Питательные среды для культивирования простейших	50
10. Питательные среды для культивирования анаэробов	53
II. Питательная среда для культивирования коринебактерий	53
12. Питательная среда для культивирования гемофильных бак- терий	54
IV. Биологический контроль питательных сред	54
У. Определение показателей эффективности	54
VI. Растворы и питательные среды для культивирования клеток и вирусов	55
Введение	56
Таблица пересчета проводимость-сопротивление	57
1. Солевые растворы	58
2. Питательные среды	60
VII. Способы стерилизации питательных сред, растворов	66
Анализированная литература	68

Назначение и цели применения питательных сред

Виноградова И.Н. (1973) предлагает следующую классификацию питательных сред, применяемых для бактериологической диагностики:

1. Среды для культивирования: универсальные простые и сложные специальные; для токсинообразования.

2. Среды для выделения и накопления: консервирующие, обогащения и селективные.

3. Среды для идентификации: дифференциальные и селективно-дифференциальные.

Байрак В.А. с соавторами (1980) по назначению выделяют среды обычные, или простые, для выращивания большинства микроорганизмов; специальные - для культивирования микробов, не растущих или плохо растущих на обычных питательных средах; дифференциально-диагностические - употребляемые для определения родовых или видовых особенностей исследуемых бактериальных культур (гемолитических, сахаролитических, протеолитических, редуцирующих и других свойств); селективные - для выделения микробов одного рода или вида из материала, содержащего смесь разных видов микроорганизмов, на которых одни виды хорошо растут, а другие не растут; среды обогащения (накопитательные).

Питательные среды применяют для выращивания микробов, выделения их в чистой культуре, изучения ряда свойств микробов и длительного сохранения свежевыделенных и производственных культур (Виргер М.О./ред./, 1982).

Принципы питания микроорганизмов

Бактерии, как и другие организмы, нуждаются для своего роста в определенных питательных веществах. В состав таких питательных веществ должны входить все те химические элементы, которые необходимы для построения клеточного материала, для активности ферментов и для работы транспортных систем. Кроме того, питательные вещества должны поставлять организму материал, используемый для генерирования биологически полезной энергии (Готтшальк Г., 1982).

Питанием называют использование питательных веществ, необходимых для роста организма (Джавец Э. с соавтор., 1982).

Доноры водорода (H⁺). Все способны к химическому синтезу организмы нуждаются в источнике энергии, в доноре H⁺ (т.е. веществе, способном к окислению). Кроме того, фотосинтезирующие организмы нуждаются в донорах H⁺ для осуществления фотосинтеза.

Акцепторы водорода. Акцепторы H⁺ необходимы для окислительно-восстановительных реакций, проходящих с образованием энергии. Дл

аэробов требуется газообразный кислород (O_2). Анаэробы нуждаются в других неорганических веществах (сульфатах, нитритах, карбонатах) или органических соединениях. В последнем случае это любой источник углерода либо образовавшийся после него в процессе катаболизма фрагмент. Однако в отдельных случаях требуется уникальный акцептор водорода, который должен присутствовать в питательной среде. (Джавец Э. с соавт., 1982).

Разделение микроорганизмов на группы по типам питания

Наиболее полезна, хотя и относительно проста, классификация, основанная на 2-х параметрах - природе источника энергии и природе основного источника углерода. По источнику энергии все организмы делятся на два типа: фотосинтезирующие организмы, способные использовать энергию света и называемые фототрофами, и организмы, нуждающиеся в химических источниках энергии - хемотрофы. Организмы, способные использовать в качестве главного источника энергии углерод CO_2 , называются автотрофами, а те которым нужны органические источники углерода - гетеротрофами. На основе этих критериев можно разделить все организмы по типу питания на четыре главных категории:

1. Фотоавтотрофы - используют свет как источник энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода. Эта категория включает большинство фотосинтезирующих организмов: высшие растения, водоросли и многие фотосинтезирующие бактерии.

2. Фотогетеротрофы - используют свет в качестве источника энергии и какое-нибудь органическое вещество как основной источник углерода. Сюда относятся некоторые пурпурные и зеленые бактерии.

3. Хемоавтотрофы - используют химический источник энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода. Они получают энергию в результате окисления таких восстановленных неорганических веществ, как $N_3NO_2^-$, H_2 , восстановленные формы серы $/H_2S, S, S_2O_3/$ или закисное железо. В эту группу входят только представители бактерий.

4. Хемогетеротрофы - используют химический источник энергии и органическое вещество в качестве основного источника углерода. Здесь и углерод и энергия обычно могут быть результатом метаболизма одного и того же органического соединения. К хемогетеротрофам относятся все многоклеточные животные, простейшие, грибы и подавляющее большинство бактерий. Внутри этой очень сложной группы возможны дальнейшие подразделения. Одно из них основано на том, в каком химическом состоянии органический материал поступает внутрь клетки. Осмотротрофы (бактерии и грибы) получают питательные вещества в рас-

творенном виде, а фаготрофы (простейшие) могут поглощать твердые частицы пищи путем фагоцитоза.

Главные и минорные биоэлементы. Только небольшое число элементов периодической системы требуется организмам в относительно высоких концентрациях (10^{-4} м). Это десять главных биологических элементов, которые наряду с некоторыми из выполняемых ими функций приведены в табл. I. Углерод, кислород, водород и азот – основные компоненты органических соединений, содержащихся в тканях различных организмов, которые могут использоваться бактериями в форме органических и неорганических соединений. Метаболизм соединений, содержащих углерод, водород, кислород имеет важное значение не только потому, что эти элементы являются основными компонентами клетки, но и потому, что эти соединения служат важными субстратами для получения микроорганизмами энергии. Снабжение водородом и кислородом осуществляется за счет поступающей в клетку воды. Источники углерода многочисленны и разнообразны. На первом месте стоят сахара, многоатомные спирты и кислоты. Углерод является составной частью всех органических соединений, в том числе белков, пептонов, аминокислот. Большинство организмов, которые зависят от органических источников углерода (а, возможно, и все они), нуждаются в очень небольших количествах CO_2 , так как это соединение необходимо для биосинтетических реакций.

Азот требуется в больших количествах, поскольку его содержание у бактерий составляет примерно 10% (в расчете на сухую биомассу). Различными микроорганизмами могут быть использованы очень многие, если не все источники азота, включая неорганические и органические его формы (NO_3^- , NO_2^- , N_2 , NH_3 , NH_2). Метаболизм источника азота обеспечивает главным образом синтез белков, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки. В клеточном белке аминокислоты составляют 1-5% от всего белка, на основании чего можно приблизительно оценить количество аминокислот, необходимых в качестве факторов роста. Исключение составляет глутаминовая кислота или глутамин, которые количественно играют большую роль в аминокислотном метаболизме и содержание которых в среде должно значительно превышать содержание остальных аминокислот (Перт С. Дж., 1978). Некоторые бактерии, нуждающиеся в нескольких аминокислотах, растут лучше при внесении в среду одной или более аминокислот в форме пептидов. Часто аминокислоты действуют как ингибиторы роста. Антагонизм между аминокислотами при их потреблении наблюдали в следующих группах:

1) фенилаланин, тирозин, триптофан; 2) серин, треонин, аланин, глицин; 3) глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота; 4) валин, лейцин, изолейцин; 5) норлейцин, метионин. Этот антагонизм связан с конкуренцией за общую пермеазу. Для некоторых организмов ферментативный гидролизат казеина становился ингибитором роста при концентрации выше 100 мкг/мл (Перт С.Дж., 1978).

Все питательные среды имеют в своей основе вещества, содержащие азот. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред служат в основном белки животного происхождения - мясо (преимущественно говяжье), рыба, мясо-костная мука, казеин. С таким же успехом применяют для этой цели заменители полноценного мяса - плаценту, кровяные сгустки, а также дрожжи; можно использовать и белки растительного происхождения (соевые бобы, горох, ячмень и т.д.) (Биргер М.О./ред./, 1982).

Сера вносится в среду в форме одного из неорганических веществ, в частности, сульфата или в виде цистеин или метионина. При аэробных условиях цистеин почти нацело превращается в цистин (Перт С.Дж., 1982).

Фосфор обычно вносят в среду в виде неорганических фосфатов. Кроме того, можно использовать органические фосфаты, такие, как глицерофосфат и фосфолипиды (Перт С.Дж., 1982).

Остальные четыре главных биоэлемента - это ионы металлов (K , Mg , Ca , Fe), используемые в качестве кофакторов ферментов, а также компонентов металлокомплексов.

При образовании биомассы микроорганизмов потребность в калии соответствует выходу биомассы и приблизительно составляет 60 г сухой биомассы на 1 г калия. Большая часть калия, вероятно, связана с РНК, так что потребность в калии увеличивается под влиянием тех факторов, которые, подобно скорости роста, ведут к увеличению содержания РНК в биомассе. Потребность в калии может меняться обратно изменению pH. Только один щелочной металл способен заменить собой калий - это рубидий, хотя такая замена снижает максимальную скорость роста. Действие ионов калия может тормозиться ионами аммония (Перт С.Дж., 1982).

Магний является кофактором многих ферментов (например, киназ); присутствует в клеточных стенках, мембранах и эфирах фосфорной кислоты. Экономический коэффициент в расчете на ионы потребленного магния варьирует от 300 до 900 г сухой биомассы в расчете на 1 г

магния и обратно пропорционален количеству РНК в биомассе (Перт С. Дж., 1982).

Экзоферменты, такие, как амилазы, протеазы, представляют собой кальцийсодержащие белки, а дипиколинат кальция служит важным компонентом эндоспор. Ионы двух- и трехвалентного железа входят в состав компонентов электропереносящей цепи, таких, как цитохромы и железосеропротейды. Калий, магний, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, и поэтому их соли всегда должны включаться в состав культуральных сред.

Помимо десяти главных биоэлементов, микроорганизмам требуется ряд других элементов, но в малых количествах (табл.2). Ионы цинка и марганца необходимы всем микроорганизмам. Цинк имеет особенно важное значение, поскольку РНК- и ДНК-полимеразы относятся к цинкпротеидам. У большинства микроорганизмов потребность в ионах натрия и хлора невелика. Большинство патогенных бактерий развивается в средах, содержащих 0,5% хлорида натрия (Пяткин К.Д., Кривошеин В.С., 1981). Биологическое значение хлорида натрия состоит в том, что он создает условия изотонии, необходимые для нормального течения всех жизненных процессов в микробной клетке (Синюшина Л.Н., Самсонова М.Н., 1981).

Микроорганизмам с особым типом метаболической активности необходимы $Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Ni$. Молибденпротеиды играют важную роль в азотном обмене и в окислении формата. Селенит или селенид нужен для образования форматдегидрогеназы клеток *Escherichia coli* при анаэробном росте, однако недостаток селена не оказывает влияния на рост указанной бактерии. Кобальт требуется всем микроорганизмам, у которых протекают реакции, зависящие от витамина B_{12} . Медь присутствует в ряде ферментов, переносящих электроны от субстратов к кислороду. В очень редких случаях микроорганизмам требуется вольфрам и никель.

Факторы роста. Однако, многие бактерии лишены способности синтезировать все органические соединения, необходимые для роста, и зависят от наличия в среде определенных факторов роста. Все эти факторы можно объединить в три группы (Готтшлак Г., 1982):

- 1) Витамины и родственные соединения, требующиеся в малых количествах;
- 2) Аминокислоты;
- 3) Пурины и пиримидины.

Общим свойством всех микроорганизмов является потребность в витаминах и родственных соединениях. Чаще наблюдается потребность в таких витаминах, как биотин, парааминобензойная кислота, тиамин, никотиновая кислота и витамин B_{12} . Потребность в факторах роста точно

установлена не для всех микроорганизмов. Поэтому микробиологи часто добавляют в среду дрожжевой экстракт и пептон в качестве полноценных и дешевых источников таких факторов (Геттшальк Г., 1982).

4. Подбор состава бактериологических питательных сред

Главная цель при подборе среды для выращивания любого микроорганизма состоит в том, чтобы создать сбалансированную смесь необходимых питательных веществ в таких концентрациях, при которых рост будет наилучшим. На первый взгляд может показаться, что нужно сделать среду как можно более богатой, добавив в нее все вещества в большом избытке. Однако, во-первых, в повышенных количествах многие питательные вещества начинают подавлять рост или оказываются токсичными. При высоких концентрациях подобный эффект дают такие органические субстраты, как соли жирных кислот (например, уксусной кислоты) и даже сахара. Подавлять рост могут и некоторые неорганические компоненты, если они окажутся в избытке. Во-вторых, даже если микроорганизм и может расти в среде с высоким содержанием питательных веществ, то в результате метаболической активности растущей популяции среда в конце концов настолько изменится, что условия будут весьма неблагоприятными и популяция станет физиологически аномальной или просто погибнет. Это может быть обусловлено сильным изменением pH, накоплением токсичных органических метаболитов, а в случае строгих аэробов – исчерпанием запасов кислорода. Таким образом, разумно ограничить общий рост культуры, вводя одно из питательных веществ в лимитирующем количестве.

При приготовлении питательных сред целесообразно составить сначала их минеральную основу, содержащую все те питательные вещества, которые можно дать любому организму в неорганической форме. Затем в эту основную среду можно ввести добавки – источник углерода, источник энергии, источник азота и необходимые ростовые факторы. Состав этих добавок, естественно, зависит от потребностей выращиваемого организма.

Среда, в которую входят только определенные химические соединения, называется синтетической.

5. Определение потребностей питания

Основные этапы определения потребностей гетеротрофных бактерий в питательных веществах заключаются в следующем.

1. Бактерии следует выращивать на такой среде (комплексной или синтетической), о которой известно, что она поддерживает их рост.

2. Если начинают выращивать бактерии на комплексной среде, то варьируют концентрации всех компонентов (от нуля до самой большой

при которой они находились в исходной среде), чтобы определить их оптимальные концентрации и необходимость для роста или его стимуляции.

3. Определив оптимальные концентрации, сначала заменяют основной сложный компонент среды, поставляющий азот (например, казеин), на полную смесь аминокислот в тех же концентрациях, которые использовали в средах для аналитического определения веществ.

4. Если эта смесь обеспечивает рост бактерий, поочередно варьируют концентрацию каждой аминокислоты от нуля до концентрации, превышающей ту, которая установлена в среде для аналитического определения. Таким образом определяют оптимальную концентрацию каждой аминокислоты в присутствии других. Если же наблюдается ингибирующий эффект, то соответствующую аминокислоту исключают из среды.

5. Заменяют сложный фактор роста, например, дрожжевой экстракт, полным набором известных витаминов и затем варьируют отдельно уровень каждого компонента смеси, как и в случае аминокислот. Если в исходной среде в качестве источника аминокислот и витаминов используют дрожжевой экстракт, то стараются заменить его полной смесью аминокислот с полным набором известных витаминов и затем варьируют в среде уровень каждого компонента отдельно.

6. Если бактерии не растут на полученной таким путем среде, то это можно объяснить тем, что они нуждаются в неидентифицированном факторе роста, или тем, что нарушено соотношение известных факторов роста. Можно также предполагать потребность бактерий в известных факторах роста (пептидах, производных витаминов, жирных кислотах, нуклеотидах, неорганических ионах и др.), которые содержатся в неочищенных компонентах комплексной среды, но отсутствуют в смесях испытуемых синтетических веществ. В этом случае необходимо детально выяснить потребность бактерий в питательных веществах.

7. Если работу начинают с использованием синтетической среды и не наблюдают хорошего роста бактерий на втором этапе, то заменяют источник азота на 10%-ный гидролизат казеина. Если это способствует росту, поступают, как указано на этапе 4; если же интенсивность роста все еще недостаточна, добавляют к среде 1%-ный дрожжевой экстракт. В случае стимуляции роста, поступают, как указано на этапе 5.

Для роста бактерий необходимы благоприятные осмотические условия и подходящая для данного организма концентрация водородных ионов. Для этого иногда приходится вводить в среду химические добавки. Даже если какая-то среда благоприятна для начального этапа роста, не исключено, что в результате химических изменений, вызываемых метаболизмом самих бактериальных клеток, дальнейшее развитие популяций в этой

среде прекратится. Например, в средах, содержащих глюкозу, в результате брожения могут накапливаться органические кислоты, которые будут подавлять рост бактерий. С другой стороны, использование или распад анионных компонентов среды в результате деятельности микробов может привести к подщелачиванию среды. Чтобы не допустить чрезмерных изменений концентрации водородных ионов, в среду часто добавляют буферы или нерастворимые карбонаты, чаще всего используют фосфатные буферы, состоящие из смеси однозамещенного и двузамещенного фосфатов (K_2HPO_4 и KH_2PO_4). Первая из этих солей слабокислая, а вторая - слабощелочная, так что если в растворе они будут содержаться в эквивалентных количествах, то такой раствор будет приблизительно нейтральным ($pH=6,8$).

Фосфаты широко используются при приготовлении питательных сред, так как это единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне - около нейтрального значения pH , и так как они малотоксичны для организма, кроме того они служат источником фосфора - одного из элементов, необходимых для роста. В высоких концентрациях фосфаты начинают подавлять рост культуры, поэтому толерантность данного микроорганизма ставит предел количеству фосфатного буфера, которое можно использовать в среде. Как правило, бактерии и грибы могут выдерживать до 5 г фосфатов калия на 1 л среды.

Если культура интенсивно продуцирует кислоту, то тех ограниченных количеств фосфатного буфера, которые можно добавлять в среду, оказывается недостаточно для поддержания нужного pH . В таких случаях для нейтрализации кислот по мере их накопления можно добавлять карбонаты в качестве "резервной щелочи". В присутствии ионов водорода карбонат превращается в бикарбонат, а бикарбонат в угольную кислоту, которая спонтанно распадается на CO_2 и воду. Так как H_2CO_3 - кислота чрезвычайно слабая и так как образующаяся при ее распаде CO_2 уходит в атмосферу, добавление в среду карбонатов предотвращает накопление в ней ионов, а значит и свободных кислот. Такие растворимые карбонаты как Na_2CO_3 , будучи сильноосновными, не подходят для культуральных сред. Наоборот, нерастворимые карбонаты используются для приготовления многих сред.

В некоторых случаях для поддержания относительно постоянного pH в культуральной среде, нельзя использовать ни буферы, ни нерастворимые карбонаты. Особая трудность возникает, например, если в среде в очень больших количествах образуются кислоты, а добавить углекислый (нерастворимый карбонат) нельзя. Еще большие затруднения встре-

Таблица I

Десять главных биоэлементов, их источники и некоторые из выполняемых ими функций у микроорганизмов
(Готтшалк., 1982)

Элемент	Источник	Функция в метаболизме
C	Органические соединения, CO ₂	Основные компоненты клеточного материала клетки
O	O ₂ , H ₂ O, органические соединения, CO ₂	
H	H ₂ , H ₂ O, органические соединения	
N	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , органические соединения	
S	SO ₄ ²⁻ , HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , органические соединения серы	Компонент цистеина, метионина, тиамилпирофосфата, кофермента А, биотина и α-липоевой кислоты
P	HPO ₄ ²⁻	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов и нуклеотидов
K	K ⁺	Основной неорганический катион в клетке, кофактор некоторых ферментов
Mg	Mg ²⁺	Кофактор многих ферментов (например, киназ); присутствует в клеточных стенках, мембранах и эфирах фосфорной кислоты
Ca	Ca ²⁺	Кофактор ферментов, присутствует в экзоферментах (амилазе, протеазе); Ca-дипиколинат является важным компонентом эндоспор
Fe	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Содержится в цитохромах, ферредоксинах и других железосеросредствах, кофактор ферментов (некоторые дегидрогеназы)

чаются, когда нужно поддерживать pH в слабощелочных средах, в которых рост бактерий приводит к образованию веществ с основными свойствами. Дело в том, что в области pH от 7,2 до 8,5 фосфатные буферы неэффективны, а других подходящих буферов для этого диапазона pH не существует. Поэтому иногда приходится периодически или непрерывно доводить pH культуры до нужной величины, стерильно добавляя в среду сильную щелочь или кислоту.

Многие организмы лучше развиваются в нейтральных средах или слабощелочных, которые можно создать с помощью подходящих буферов.

Нередко в процессе стерилизации питательных сред выпадает осадок. Особенно часто это происходит, если среда содержит относительно высокие концентрации фосфатов (образуются нерастворимые комплексы фосфатов с некоторыми катионами, особенно с кальцием и железом). Обычно это не сказывается на питательной ценности среды, но осадок может затруднить наблюдение за развитием микроорганизмов или количественную оценку их роста. Образование осадка можно избежать, если отдельно стерилизовать концентрированные растворы солей кальция и железа, а затем добавлять их к уже простерилизованной и охлажденной среде. Эту трудность также можно обойти, добавив в среду небольшое количество вещества, которое образует с этими металлами растворимый комплекс (хелат) и предотвращает тем самым образование ими нерастворимого комплекса с фосфатами. Чаще всего для этого используют этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в концентрации около 0,01%.

Стабильность среды (Перт С. Дж., 1978)

Главные факторы, влияющие на стабильность среды - это природа его компонентов; способность взаимодействовать их друг с другом; температура, особенно во время стерилизации нагреванием; pH среды, кислород, свет.

Аминокислоты, в частности, триптофан, глутамин и аспарагин являются наиболее лабильными, и по этой причине их нельзя стерилизовать нагреванием, а используют для стерилизации ультрафильтрование. Глутамин полностью разлагается до γ -кетопирролидина при нагревании в водном растворе до 100°C и pH=7,0 и выдерживании при таких условиях в течение 3-х часов, даже при 37°C разложение глутамина идет с заметной скоростью. Цистеин в присутствии кислорода быстро превращается в цистин, растворимость которого значительно ниже (около 0,2% при 20°C), чем у цистеина. Однако с точки зрения питательной ценности цистеин и цистин взаимозаменяемы.

Из водорастворимых витаминов тиамин, рибофлавин, пиридоксин

больше всего подвержены распаду. При доступе кислорода и 37°C растворенный в воде тиамин окисляется в течение недели приблизительно на 50% и теряет биологическую активность. Он распадается при автоклавировании в течение 5 мин. при 121°C. Рибофлавин разрушается в процессе автоклавирования при 121°C в течение 1 ч. при pH=7,0, но при кислых значениях pH он более устойчив. Рибофлавин светочувствителен и под действием комнатного рассеянного света при 32°C может разрушиться за 1 ч. на 50%, однако имеются данные и о менее интенсивном разложении рибофлавина - на 13% за 157 ч. Чувствительностью к свету обладают также фолиевая кислота и пиридоксин, но они теряют активность в меньшей степени, чем рибофлавин.

Сахара тоже способны до некоторой степени разлагаться при автоклавировании в присутствии неорганических солей и органических соединений, что часто сопровождается окрашиванием в коричневый цвет. Глюкозиды с фуранозидными группами, например сахароза, при кислых значениях pH и при нагреве гидролизуются, что во многих случаях не оказывает пагубного действия на культуру, однако для поддержания постоянных условий этого следует избегать. Чистые растворы сахаров обычно устойчивы к автоклавированию.

Из неорганических солей аммония следует автоклавировать при pH ниже 7,0, иначе некоторая часть аммиака улетучивается. В средах определенного химического состава основные потери ионов магния, калия, аммония, натрия и фосфата в форме ионов могут происходить при осаждении недостаточно хорошо растворимых солей: смешанной фосфорнокислой соли магния и аммония, фосфорнокислой соли магния и калия, фосфорнокислой соли магния и натрия. В течение нескольких первых часов после приготовления раствора осаждение может и не происходить. По этой причине соль магния нужно автоклавировать отдельно от фосфатов. Растворимость сульфата кальция составляет примерно 0,2%, а фосфатная соль слабо растворима. В средах, не содержащих комплексобразующих агентов, фактически все ионы железа способны выпасть в осадок, создавая недостаток железа в среде, если не проводят сильного подкисления раствора. Фильтры Зейтца могут абсорбировать ионы железа и создавать таким образом дефицит по железу. Естественные среды содержат обычно аминокислоты и другие соединения, хелатирующие микроэлементы. Многие минимальные среды, рекомендованные в литературе, имеют тот недостаток, что не содержат комплексобразующих агентов, предотвращающих осаждение железа и других микроэлементов. Для жизни облигатных аэробов необходим кислород. Аэробные микроорганизмы хорошо растут на поверхности агара на чашках или в тонком слое жидкой

Таблица 2

Элемент	Источники	Функция в обмене веществ
Zn	Zn^{2-}	Содержится в алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК-полимеразе
Mn	Mn^{2-}	Содержится в бактериальной пероксидаземутазе; кофактор некоторых ферментов (фосфоенолпируват-карбоксикиназы, цитрат (2С)-синтазы).
K	K^+	Необходимы галофильным бактериям
Cl	Cl^-	
Mo	MoO_4^{2-}	Содержится в нитратредуктазе, нитрогеназе и форматдегидрогеназе
Ca	Ca^{2+}	Содержится в глицеринредуктазе и форматдегидрогеназе
Co	Co^{2+}	Содержится в коферменте витамин В ₁₂ -ферментов (глутаматмутаза, метил-малонил-СФА-мутаза)
Cu	Cu^{2-}	Содержится в цитохромоксидазе
W	WO_4^{2-}	Содержится в некоторых форматдегидрогеназах
Ni	Ni	Содержится в уреазе; требуется для автотрофного роста водородных бактерий

- 14 -

среды. В перемешиваемых жидких культурах рост обычно происходит только у поверхности, а в глубине создаются анаэробные условия, и рост там невозможен. Поэтому для получения больших популяций в жидких культурах среду необходимо аэрировать. С этой целью в лабораториях используют различные устройства для встряхивания, которые аэрируют среду, непрерывно перемешивая ее.

Многие строгие анаэробные микроорганизмы весьма чувствительны к молекулярному кислороду и быстро гибнут при контакте с ним. Поэтому соприкосновение таких культур с воздухом должно быть сведено к минимуму или полностью исключено. Анаэробные условия создаются путем наслаивания вазелинового или парафинового масла (уменьшается диффузия кислорода из воздуха), введения в среду кусочков печени, фарша и других веществ (окислителей кислорода, находящегося в среде) и регенерацией среды (освобождение питательной среды от кислорода путем прогревания ее в кипящей водяной бане и последующего быстрого охлаждения) перед посевом микробов.

7. Техника изготовления питательных сред

1. Необходимо тщательно промывать посуду водой и обязательно проверять на нейтральность.

2. Следует строго соблюдать порядок внесения ингредиентов и момент внесения в соответствии с инструкциями и прописью. В противном случае могут выпасть осадки.

3. Определение pH питательной среды (колориметрическим способом с помощью компаратора Михаэлиса, либо потенциометрически с помощью потенциометра). Устанавливая pH среды, следует делать это осторожным внесением щелочи или кислоты, не допуская перещелачивания или закисления. Внесение кислоты при перещелачивании ухудшает качество среды. Внесение щелочи при избытке кислоты может послужить причиной образования осадков после стерилизации.

4. Следует иметь в виду, что при установлении реакции среды подщелачиванием едким натром, pH после кипячения и стерилизации падает на 0,2, а при изготовлении сред с настоем печени, витамин-В комплексом, pH снижается на 0,3-0,4. Поэтому при изготовлении среды устанавливают pH на 0,2-0,4 выше заданного, кипятят, она не понизится на 0,2-0,2, снова проверяют pH, исправляют в случае необходимости и тогда уже среду подвергают стерилизации в автоклаве. Учитывая, что в этом случае pH может измениться (на 0,1-0,2), обязательно проверяют pH после стерилизации.

Если глюкоза или другой сахар входит в состав среды, имеющей pH 7,9-8,1, то во избежание гидролиза углевода (сопровождается резким

закислением среды до pH 6,0-5,0) растворы сахаров стерилизуют отдельно и вносят в среду стерильно перед посевом.

5. Осветление питательных сред. Для обеспечения прозрачности питательных сред в некоторых случаях рекомендуется предварительная стерилизация гидролизатов при различных зонах pH с последующей фильтрацией выпадающих осадков. Однако к этому приему лучше прибегать в тех случаях, когда не удается добиться прозрачности сред при изготовлении их из хорошо отстоявшихся (не подвергшихся стерилизации) гидролизатов, экстрактов и т.д., а также осветления можно добиться с помощью яичного белка или кровяной сыворотки. Для этого на каждые 1-2 л среды, остуженной до 50°C, прибавляют белок одного куриного яйца или 25-30 мл кровяной сыворотки. Яичный белок нужно предварительно хорошо размешать с двойным объемом холодной воды. Среду хорошо размешивают и кипятят 10-15 мин. (Виргер М.О.).

При изготовлении питательного агара необходимо вносить агар-агар при нейтральной реакции. Агар-агар, растворяемый при кислой реакции, после автоклавирования среды не застынет. Агар-агар лучше вносить в момент изготовления среды, а не добавлять его в стерильный бульон и снова подвергать стерилизации. Во избежание ухудшения качества среды следует стремиться к сокращению времени тепловой обработки (варка, стерилизация).

В агар-агаре могут встречаться ингибиторы роста. Они удаляются при промывке агар-агара (Матвеев М.И. (ред.) 1973).

6. Фильтрация питательных сред. Жидкие и полужидкие питательные среды фильтруют через фильтровальную бумагу, предварительно смоченную водой, или фильтровальное полотно, агаровые среды - через ватно-марлевый фильтр. Вата предварительно замачивается в воде и отжимается.

7. Разливка питательных сред в пробирки, флаконы, колбы, матрасы, бутылки.

II. Приготовление полуфабрикатов питательных сред

I. Приготовление мясной воды

Мясная вода (мясной экстракт) является полуфабрикатом-основой для приготовления многих бактериологических сред: мясопептонного бульона, агаров различных концентраций и др. Она содержит белки, углеводы, витамины, минеральные вещества. Для приготовления мясной воды лучше всего использовать говяжье мясо вышних сортов от молодых животных (высокие питательные свойства, прозрачность). Мясная вода из мяса старых животных плохо фильтруется, имеет серый цвет, дает большой осадок, токсинообразование на средах из такой воды ниже.

Приготовление: I. Мясная вода готовится в разных концентрациях. Для этого берут следующие соотношения мясного фарша и воды:

Пропись: мясной фарш 1,0 кг
(мясная вода 1:1)
дистиллированная
или холодная водопро-
водная вода 1,0 л

Пропись: мясной фарш 0,5 кг
(мясная вода 1:2)
дистиллированная
или холодная
водопроводная
вода 1,0 л

Пропись: мясной фарш 0,25 кг
(мясная вода 1:4)
дистиллированная
или холодная
водопроводная
вода 1,0 л

Во всех случаях на выкипание добавляется 10% воды.

Мясную воду можно готовить двумя способами:

1-й способ: мясной фарш нужно варить сразу же, нагревая его до кипения. За это время фарш уваривается, уменьшается в объеме, особенно это заметно при приготовлении мясной воды 1:1. Фарш до варки размешивается с трудом, после варки свободно. При этом вес мяса уменьшается на 30-40%, главным образом за счет вытеснения воды, ранее связанной с белками. Фарш из красного становится серым. После этого варить еще один час.

Для определения готовности мясной воды нужно профильтровать небольшое ее количество через бумажный фильтр, если жидкость готова, то мясная вода будет прозрачная.

2-й способ: мясной фарш заливается мясной водой и экстрагируется в течение 18-24 часов при +4°C. Варить как описано выше.

Отстоявшуюся прозрачную часть мясной воды темно-золотого цвета (1:1) или соломенно-желтого (1:2 или 1:4) фильтруют через полотняный или складчатый бумажный фильтр. В этой воде после автоклавирования обычно не выпадает осадок и такую воду можно сразу затаривать с необходимой концентрацией пептона и хлористого натрия, что удобно при последующем приготовлении сред.

Готовую мясную воду разливают в стерильные бутылки с ватно-марлевыми пробками на 3/4 емкости.

Стерилизуют при 121°C (I атмосфера) 30 мин.

В результате стерилизации в мясной воде снижается количество витаминов. Этого можно избежать, сохраняя мясную воду нестериль-

но, добавив в виде консервантов хлороформ или соляную и уксусную кислоты.

Хлороформ добавляют к мясной воде с pH 6,2-6,5 в количестве 1%, если pH иной, то его доводят соляной кислотой.

Соляная кислота добавляется в количестве 0,7 мл (уд.в.1,19) на 100 мл мясной воды. pH мясной воды после добавления кислоты 1,9. Процент образующейся соли после нейтрализации - 0,5%, и мясолоптонный бульон полностью обеспечивается необходимым количеством хлорида натрия

Уксусная кислота добавляется в количестве 1,4 мл на 100 мл мясной воды (уд.в.1,0055), что дает pH=3,71 с содержанием хлористого натрия после нейтрализации 2,0%.

Биохимический состав мясной воды

Общий азот мг%	198-360
Остаточный азот мг%	145-330
Аминный азот мг%	45-98
Сухой остаток %	1,56-3,06
Полипептиды %	1,55-2,35

2. Приготовление пептона Мартена

Мартеновский пептон - это пептон частичного переваривания. Он получается путем неполного гидролиза белков стенок свиных желудков, ферментами желудочных желез, главным образом, пепсином в присутствии соляной кислоты. Этот гидролиз ведется в условиях, близких к перевариванию белков в желудке организма животных. Он характеризуется наличием сильно кислой реакции: pH=2,23 (1,3-2,5). Такая кислотность способствует набуханию белков, благодаря чему облегчается действие протеолитических ферментов и в связи с этим ускоряется процесс гидролитического расщепления белка. Кроме того указанная кислотность является благоприятной для перевода неактивного пепсиногена в активный провезалитический фермент - пепсин, оптимальное значение pH для которого 1,5-2,5 при 40°C. Пепсин легко расщепляет мышечные белки, а также альбумины и глобулины.

Продукты гидролиза белка пепсином часто называют пептонами. Пептоны - смесь более или менее сложных полипептидов, в состав которых входят также свободные аминокислоты, в частности, триптофан.

Гидролиз при помощи ферментов (пепсина) отличается большей мягкостью, чем кислотный, что сохраняет лабильные факторы роста.

Для приготовления Мартеновского пептона берут свежие (свиные) свиные желудки с мускулистыми упругими стенками, без содержимого,

с большим количеством слизи, без катаральных явлений. Желудки, пропитанные желчью, отбрасываются. Отбор желудков лучше делать утром, когда животных забивают натоках.

Переваривание можно считать законченным, когда фарш станет однородным, осадок незначительным, серого цвета и надосадочная жидкость приобретает соломенно-желтый цвет. При этом у нее должны быть следующие показатели, характеризующие химический состав пептона:

Общий азот мг%	450-600
Аминовый азот мг%	130-150
Свободный триптофан мг%	65,5
Пептон %	0,6-4,0
Степень расщепления %	20-25%

Приготовление основного (кислого) пептона

Пропись: фарш свиных желудков	250,0 г
водопроводная вода +45°C	1,0 л
соляная кислота уд. в. 1,19	19,0 мл

1. Получение фарша. Желудки складывают слизистой внутрь, тщательно очищают от жира, вытирают сухой чистой тряпкой и проверяют наличие катаральных явлений, металлических предметов.

Для получения фарша можно использовать и мороженные желудки, но им дают сначала оттаять при комнатной температуре и после этого обрабатывают как свежие.

2. После получения фарша приготовление пептона ведут двумя способами:

1-й способ (ручной). 1) Фарш расфасовывают по бутылкам; 2) Заливают подкисленной и подогретой до +45°C водой, тщательно перемешивают и ставят в термостат при +45°C + 50°C; 3) Перемешивание фарша в течение первых суток производят каждые два часа.

При ручном способе переваривание длится 18-32 часа. Если же переваривание проводится при +37°C, то оно еще больше удлинится.

Переваривание считается законченным при наличии однородного серого осадка в небольшом количестве, плоско оседающем при взбалтывании, соломенно-желтого цвета надосадочной жидкости и соответствующих химических показателях.

2-й способ (механический). Фарш закладывает в полиэтиленовые баки емкостью 40 л, заливает подкисленной и подогретой до +48-50°C водой, ставят на турбомаги при +45°C. Так как турбомаги меньше по диаметру, чем баки и их нужно отцентрировать по отношению к магниту, то баки нужно оставлять на подставках несколько сантиметров выше

(около 0,5 см). Для перемешивания 30,0 г пептона Мартена достаточно иметь магнит длиной 6,5 см; на 10,0 г - 2,5 см.

Применение механического перемешивания дает возможность получить пептон быстрее, с более стабильными показателями и освобождает от применения ручного труда.

Нейтральный пептон

Отстоявшийся кислый Мартеновский пептон декантируют (отсасывают сифоном, не забирая осадка), подогревают на медленном огне до 60-80°C и нейтрализуют 10- или 20%-ным едким натром до pH=5,6-6,0. Кипятят 10-20 мин. Дают отстояться 2-3 часа в теплом месте. Образуется осадок. Фильтруют через вату или подотно. Разливают в бутылки по 3/4 емкости. Стерилизуют при 110-112°C 30 мин.

3. Мясной перевар по Хоттингеру

При получении перевара по Хоттингеру используется ферментативный гидролиз с помощью добавления фарша поджелудочной железы (свежего или мороженого), или панкреатина, как очищенного, так и неочищенного. Поджелудочная железа выделяет сок с pH=7,8-8,4, в состав которого входят ферменты: трипсин (расщепляет белок), амилаза (углеводы), нуклеаза (нуклеиновые кислоты), липаза (жиры). Трипсин расщепляет около 60% пептидных связей, а при предварительном легком кислотном воздействии до 70%, а также амидные и эфирные связи. Он реагирует с отрицательными ионами белка.

Ферментативный гидролиз мягче кислотного, поэтому при его использовании происходит неполный гидролиз, сохраняются лабильные факторы роста.

Показателем начавшегося гидролиза является положительная минигринная реакция, выявляющая появление свободных аминокислот.

Показателем окончания гидролиза является превращение мясного фарша в гомогенную серую массу, фильтрат принимает соломенно-желтый цвет, перевар легко фильтруется, прекращается нарастание аминокислот азота, наблюдается отрицательная биуретовая реакция и положительная реакция на триптофан.

Степень гидролиза в готовой среде характеризуется количеством общего, аминокислотного азота и триптофана. В зависимости от их содержания различаются триптические перевары глубокого и неполного расщепления.

Биохимический состав перевара Хоттингера
(Телишевская Л.И. и др., 1963)

Общий азот мг%	1025-1285
Остаточный азот мг%	900-1200
Аминый азот мг%	830-905
Сухой остаток %	8,3-9,6
Полипептиды %	3,80-4,20

Применение триптического перевара имеет ряд преимуществ при приготовлении бактериологических питательных сред по сравнению со средами приготовленными на мясной воде: 1. Химический состав их более постоянен, чем приготовленных на мясной воде; 2. Наличие в переварах значительного количества аминокислот, которые создают большую буферность, а, следовательно, и стабильность pH; 3. Приготовление сред на переварах Хоттингера является более выгодным, так как из одного и того же количества мяса получается бульона в 5-10 раз больше чем из мясной воды.

Приготовление триптического перевара неполного расщепления

Пропись: Сырой говяжий фарш	100,0 г
Водопроводная вода +45°C	200,0 мл
Панкреатин в 45 ед. или фарш поджелудочной железы	10-12%
Оропон (высушенный соскоб слизистой оболочки, можно добавлять для активирования)	1-3%
Желчь	1%
Хлороформ	1%

Способ приготовления: 1. Экстракт мясного фарша (1:1).

Пропись: фарш говяжий 100,0 г
водопроводная вода 100,0 мл

Размешать при +4-10°C на 12-18 часов оставить экстрагироваться.

2. После экстрагирования (утром) добавить столько же воды, т.е. 100 мл. Таким образом, получается экстракт 1:2 Подогреть до +50°C (не выше) и подщелачивать 20%-ным едким натром до pH=8,0-8,1. При добавлении щелочи нужно тщательно перемешать фарш, чтобы не произошло комкования, которое мешает перевариванию.

3. Приготовление фарша поджелудочной железы. Поджелудочная железа тщательно очищается от жира и пленок и двукратно измельчается на мясорубке, для консервации добавляется 0,5% хлороформа. Приготовленная таким образом железа хранится в холодильнике при -4°C под резиновой пробкой, использовать ее можно через 2-3 дня после пригото-

ления. Необходимое для добавления количество фарша делят на три части, первые две большие.

4. Приготовление панкреатина. Необходимое количество панкреатина перед добавлением тщательно размешивают с водой и делят на три части, как и фарш поджелудочной железы.

5. В перевар с температурой около 50°C и pH 8,0-8,1 закладывает-ся первая часть панкреатина или фарша поджелудочной железы. Отмечает-ся время переваривания.

6. Через 30 мин. проверяется pH (отсутствие сдвига pH указывает на то, что поджелудочная железа или панкреатин недостаточно активны и нужно увеличить их количество).

7. Через 30 мин. эта манипуляция повторяется.

8. Через 1,5 часа с начала переваривания проверяется количество аминокислотного азота. Оно должно быть равным 200,0-300,0 мг%. Если нет, то еще добавляется фарш или панкреатин.

9. В течение всего времени переваривания нужно тщательно следить за температурой. Она не должна быть выше $+50^{\circ}\text{C}$, т.к. инактивируется фермент, и не ниже $+40^{\circ}\text{C}$, т.к. будет брожение.

Весь процесс переваривания длится около 4-х часов и количество аминокислотного азота должно достигнуть до 450,0-500,0 мг%, но не более 530,0 мг%.

10. Через 4 часа добавляется 1,5 мл ледяной уксусной кислоты на 1 л перевара, затем кипячение 10-15 минут. Прибавление кислоты прерывает процесс ферментации, а уксусная кислота еще и придает среде буферные свойства.

11. В горячем виде перевар фильтруется через плотный фильтр и расфасовывается.

12. После остывания (на следующий день) добавляется 1% хлороформа и стерилизуется при 120°C .

Приготовление триптического перевара полного расщепления

Пропись: Сырой говяжий фарш	100,0 г
Водопроводная или дистилли- рованная вода $+45^{\circ}\text{C}$	150,0 мл
Фарш поджелудочной железы	9,5-10%
или Панкреатин (45 ед.)	0,5-1%
Хлороформ х.ч.	1,5 мл

Способ приготовления: I. Мясной фарш расфасовывают по бутылкам, добавляют воду, тщательно перемешивают.

2. Смесь густедеачивают до pH=8,0. На 1 л смеси расходуется около 13,3 мл 10%-ного едкого натра.

3. В смесь добавляют 10% фарша поджелудочной железы или 0,5-1% панкреатина в 45 ед. и 1,5 мл хлороформа.

4. Бутылки закрывают резиновыми пробками, хорошо перемешивают.

5. После перемешивания открывают пробку и выпускают образовавшиеся газы (в первые трое суток пробку нельзя закрывать плотно, иначе её вырвет газами).

6. Ставят для переваривания при +45°C.

7. Перемешивание производят как можно чаще, желательны каждые 2 час.

8. На следующий день проверяют pH, который должен снизиться до 7,0. Добавляют щелочи до pH=8,0.

9. В течение последующих 2-х суток перемешивание нужно производить через 3-4 часа. Ночью перемешивают не менее 2-3 раз, затем реже.

10. Затем перемешивают 2 раза в сутки.

В течение первых трех суток нужно тщательно следить за pH и при снижении его подщелачивать. Всего на переваривание 1 литра смеси уходит около 40 мл 10%-ного едкого натра.

11. Полное переваривание заканчивается в течение 5-8 суток. Мясной фарш превращается в гомогенный сероватый порошок, над которым при правильном переваривании отстает верхний слой прозрачной жидкости соломенно-желтого цвета. К этому времени pH стабилизируется (7,4-7,1) и количество триптофана начинает падать. Если при стоянии выпадает белый осадок (тирозин), то это является признаком хорошего переваривания. Перевар должен еще до полной готовности постоять дней 20 при +4°C, а потом его можно употреблять для приготовления сред. За это время происходит медленное нарастание аминного азота и оседание осадка, благодаря чему его можно декантировать, объем надосадочной жидкости будет больше.

12. Затем, как и к перевару неполного расщепления, добавляется 1% хлороформа. Хранить при +4°C.

4. Печеночный экстракт

Печень богата гликогеном, глюкозой, желчными пигментами, витаминами, ферментами и т.д. При приготовлении печеночного экстракта большая часть этих веществ переходит в раствор, и среды, приготовленные на печеночном экстракте, в питательном отношении являются обогащенными по сравнению со средами, приготовленными на мясной воде.

Печеночный экстракт употребляется для изготовления мясо-пептонно-печеночного бульона и агара.

Пропись:

Печень кусками 50,0-70,0	1000,0 г
Водопроводная или дистиллированная вода (печеночный экстракт 1:1)	1000,0 мл
Водопроводная или дистиллированная вода (печеночный экстракт 1:2)	2000,0 мл

Способ приготовления

Нарезанную кусками печень залить дистиллированной или водопроводной водой и экстрагировать в течение 15 часов. Затем варить 15-20 мин. После отстаивания фильтровать через полотняный фильтр. Стерилизовать при 120°C 30 мин.

После стерилизации печеночный экстракт имеет темно-коричневый цвет с зеленоватым металлическим оттенком и небольшим рыхлым осадком темного цвета. Перед употреблением осадок отфильтровывается через вату.

5. Сердечный экстракт

Готовится точно также, как и печеночный экстракт.

6. Дрожжевой экстракт

200 г прессованных пекарских дрожжей размалывают на мелкие кусочки, суспендируют в 1 л дистиллированной воды, кипятят при постоянном перемешивании, пока не сойдет пена. Затем многократно фильтруют через бумажный фильтр до тех пор, пока фильтрат не станет прозрачным. Автоклавируют при 115°C 30 мин.

7. Определение триптофана

Определение свободного триптофана часто используют как тест на полноту ферментативного гидролиза. Так, по мере расщепления белков мяса при изготовлении переваров Хоттингера содержание триптофана возрастает, по окончании гидролиза - сначала стабилизируется, затем начинает падать в связи с частичным разрушением этой аминокислоты.

Определение свободного триптофана по методу М.А.Нешкова

Метод дает завышенные результаты для питательных сред, но удобен для сравнительных исследований в процессе гидролиза.

Реактивы:

- 1%-ный раствор хлорамина В (хлорамин В содержит 26-29% свободного хлора). 1 г сухого хлорамина растворяют в 99 мл воды и фильтруют. Раствор готовят перед применением.

- ледяная уксусная кислота.

Ход определения

В пробирку вносят 1 мл испытуемого раствора (питательной среды или 2%-ного раствора гидролизата), добавляют 4 мл дистиллированной воды, 1 мл ледяной уксусной кислоты и титруют из бюретки 1%-ным раствором хлорамина. При этом появляется розовая окраска. По мере добавления хлорамина она усиливается до красной, и, пройдя наиболее интенсивную стадию, переходит в желтую или грязно-бурую (конец титрования). Обычно переход происходит от одной капли хлорамина, в связи с чем при появлении окрашивания его следует приливать по одной капле, тщательно встряхивая.

Расчет:

$$X = A \cdot 100$$

где X - количество триптофана, мг%

A - количество хлорамина, пошедшее на титрование, мл

100 - пересчет на 100 мл испытуемого раствора

Определение содержания аминокислотного азота в питательных средах см. в "Методических рекомендациях по физико-химическому и биологическому контролю белковых гидролизатов для бактериологических питательных сред" (простяков А.П., Рогожин С.П., Фоменко А.С. и др.), МСХ СССР, ВНИИТИБП, ВГНКИ ветпрепаратов МСХ СССР, М., 1983.

III. ОСНОВНЫЕ И СПЕЦИАЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

I. ОСНОВНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

№ п/п	Название среды	Наименование ингредиента	К-во ингредиентов (г, мл) на объем среды (мл)				рН до стерилиз.	Режим стер.	Примечание
			1000	3000	5000	10000			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Пептонная вода	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	7,6-7,7	Автоклав. при 115°C 30 мин.	Фильтруется через бумажный фильтр
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
2.	Мясопептонный бульон	Водопр. водная вода	500	1500	2500	5000	7,7	"-	Фильтруется через бумажный фильтр
		Мясная вода	500	1500	2500	5000			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Пептон	10	30	50	100			
3.	Мясопептонный агар	Водопр. водная вода	500	1500	2500	5000	"-	"-	Осаждается яичным белком (1 белок на 1 л) Фильтруется через ватно-марлевый фильтр
		Мясная вода	500	1500	2500	5000			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	25	75	125	250			
4.	Мясопеченочный агар	Водопр. вода	500	1500	2500	5000	7,3-7,4	Автоклав. при 115°C 30 мин.	Осаждается яичным белком (10. на 1 л.) Фильтруется через ватно-марлевый фильтр. Глюкозу добавлять перед фильтром.
		Мясная вода	250	750	1250	2500			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Глицерин	20	60	100	200			
		Глюкоза	10	30	50	100			
		Агар-агар	25	75	125	250			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5.	Мясопеченочный бульон	Готовится также как и агар, но без добавления агара	-"	-"	-"	-"	-"	-"	-"
6.	Среда Китт-Тароци	Водопроводная вода	375	1125	1875	3750			Разливается в пробирки с кусочками печени, сверху наслаивается вазелиновое масло
		Мясная вода	375	1125	1875	3750			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500	8,4	-"	
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	3	15	25	50			
7.	Бульон на переваре Хоттингера (33 мг% ам. аз.)	Перевар Хоттингера (33 мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	6,1-6,3	-"	
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
8.	Бульон на переваре Хоттингера (100 мг% ам. аз.)	Перевар Хоттингера (100 мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	7,8-8,0	-"	
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
9.	Бульон на переваре Хоттингера (200 мг% ам. аз.)	Перевар Хоттингера (200 мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	7,6-7,8	-"	
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
10.	Бульон на переваре Хоттингера (300 мг% ам. аз.)	Перевар Хоттингера (300 мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	7,4-7,6	-"	
		Натрий хлористый	5	15	25	50			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11. Дрожжевой мясопер-тонный бульон	Водопро-водная вода		500	1500	2500	5000	7,4- 7,6	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Фильтру-ется че-рез бу-мажный фильтр
	Дрожжевой экстракт		100	300	500	1000			
	Мясная вода		400	1200	2000	4000			
	Пептон		10	30	50	100			
	Натрий хлористый		5	15	25	50			
12. Дрожжевой агар	Водопро-водная вода		900	2700	4500	9000	-"	-"	Осаждает-ся белок (1 белок на 1 л.) фильтру-ется че-рез ва-тно марлевый фильтр.
	Дрожжевой экстракт		100	300	500	1000			
	Натрий хлористый		5	15	25	50			
	Пептон		10	30	50	100			
	Агар-агар		25	75	125	250			
13. Агар по ВГНКИ (с 0,15% агара)	Водопро-водная вода		500	1500	2500	5000	7,3	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Среда с 2% агара осаждает-ся (1 белок на 1 л.) агара фильтру-ется че-рез бу-мажный фильтр
	Мясная вода		250	750	1250	2500			
	Печеночная вода		250	750	1250	2500			
	Пептон		10	30	50	100			
	Натрий хлористый		5	15	25	50			
	Агар-агар		1,5	4,5	7,5	15			
14. Картофель-ный агар (по Кар-неевой)	Водопро-водная вода		1000	3000	5000	10000	7,0	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Ингреди-енты до-бавл. в картофе-льный буль-он. После застыва-ния сре-ды осадок срезает-ся.
	Очищен-ный кар-тофель		500	1500	2500	5000			
	Пептон		10	30	50	100			
	Глицерин		30	90	150	300			
	Глюкоза		10	30	50	100			
	Натрий хлористый		5	15	25	50			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15.	Среда Дорса	Иичная масса Рингера	На I яйцо раствора	10 мл			Не уста-нав-лив.	Стерилизовать в аппарате для свертывания сыдоротки крови при 75°C по I часу 3 дня	
16.	Раствор Рингера	Хлористый кальций (CaCl ₂)	0,25	0,75	1,25	2,5	Не уста-навлив.		
		Хлористый калий (KCl)	0,42	1,26	3,0	4,2			
		Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000			
		Хлористый натрий	9,0	27,0	45	90			
17.	Среда № 27	Гидролизат Хот-тингера (33мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	6,1-6,3	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	
		Глюкоза	10	30	50	100			
		Агар-агар	15	45	75	150			
18.	1,5%	Гидролизат Хот-тингера (135мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	5,7-5,9	" "	
		Однозамещ. фосфат калия (KH ₂ PO ₄)	25	75	125	250			
19.	1,5%	Гидролизат Хот-тингера (140мг% ам. аз.)	1000	3000	5000	10000	7,8-8,0	" "	
		Двузамещ. фосфат натрия (Na ₂ HPO ₄)	3	9	15	30			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20.	Среда № 28	Гидролизат Хоттингера (33мг%ам.аз.) Двузамещ. фосфат натрия (Na ₂ HPO ₄) Агар-агар	1000	3000	5000	100000	7,8-8,0	Автоклав. при 115°C 30 мин	
			3	9	15	30			
			15	45	75	150			
21.	Тиогликолевая среда	Гидролизат казеина Дрожжевой экстракт 10%-ный Агар-агар Глюкоза Цистин Тиогликолевая кислота Дистилл. вода	15	45	75	150	7,3	Автоклав. при 121°C 20 мин.	Гидролизат и тиогликолевую кислоту добавляют после фильтрации.
			5	15	25	50			
			0,752	2,25	3,75	7,5			
			5	15	25	50			
			0,752	2,25	3,75	7,5			
			0,3	0,9	1,5	3			
			1000	3000	5000	10000			
3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МИКРООРГАНИЗМОВ									
22.	Среда Булара	Мясная вода Пептон Натрий хлористый Маннит	1000	3000	5000	10000	7,0	Автоклав. при 115°C 30 мин.	В готовую среду добавляют 0,1% р-р нейтральрота. Разливают в пробирки с газовыми.
			12,5	37,5	72,5	125			
			5	15	25	50			
			7,5	22,5	37,5	75			
23.	Среда Гисса (сахара)	Пептонная вода Сахар (требуемый) Индикатор Андрёде	100	200	300	400	7,7	Автоклав. при 115°C 30 мин.	Сахар к объему-0,5%, реактив Андрёде - 1 мл на 100 мл. Разливается в пробирки по 5 мл.
			0,5	1	1,5	2			
			1	2	3	4			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24.	Пептонная вода для сахаров (полу-видная)	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	7,7		
		Пептон 1%	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар	3	9	15	30			
25.	Среда Балчева	Дистилл. вода	на 625 мл среды				7,2	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Газливая. Отсы в пробирки по 5 мл
		Мясная вода	125	375	625	1250			
		Пептон	7,5	22,5	37,5	75			
		Цистин	0,1	0,3	0,5	1			
		Натрий хлористый	1,5	4,5	7,5	15			
		Фосфорно-кислый натрий однозамещ. NaH_2PO_4	1	3	5	10			
		Серно-кислый натрий Na_2SO_4	0,5	1,5	2,5	5			
		Железо лимонно-аммиачное зеленое $\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,5	1,5	2,5	5			
		Фениловый красный	0,0025	0,0075	0,0125	0,025			
		Агар-агар	0,5	1,5	2,5	5			
		26.	Мясо-пептонный агар с 0,2% крахмала	Мясо-пептонный агар	1000	3000	5000	10000	7,4
Крахмал	2			6	10	20			
27.	Мясо-пептонный бульон с 0,2% KNO_3	Мясо-пептонный бульон	1000	3000	5000	10000	"		
		Калий азотно-кислый KNO_3	2	6	10	20			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
28. Среда Кларка	Дистилл. вода		1000	3000	5000	10000	-"-			
	Глюкоза			5	15	25	50			
	Пептон			5	15	25	50			
	Фосфорно-кислый калий однозамещ. KH_2PO_4			5	15	25	50			
29. Среда Симмонса	Дистилл. вода		1000	3000	5000	10000	7,2	Авто-клав. при 115°C 30 мин.		
	Аммоний фосфорно-кислый однозамещ. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$		1,5	4,5	7,5	15				
	Серно-кислый магний $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,2	0,6		1	2			
	Цитрат натрия 3-х основн. $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			3	9	15	30			
	Агар-агар		20	60	100	200				
	Бромтимол блау 0,2%		10	30	50	100				
	30. Агар с мочевиной	1,7-2% агарная основа		1000	3000	5000	10000	7,3	Стерилизуется 2-хкратно в стекучим паром по 15-20 мин.	Разливается в пробирки
		Глюкоза			3	9	15	30		
50% р-р мочевины				20	60	100	200			
Бромтимол-блау 0,2%				50	150	250	500			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
31.	Среда с сернокислым железом (для определения сероводорода)	2% агаровая основа Сернокислое железо Fe_2SO_4 Гипосульфит $Na_2S_2O_3$ $.5H_2O$ Глюкоза Фенолрот 0,2%	1000	3000	5000	10000	7,3		Стери-Разлива- лиз. ется в дробно стериль- 3 дня ные про- по 20 бирки мин. теку- чим паром	
			0,2	0,6	1	2				
			0,3	0,9	1,5	3				
			1	3	5	10				
			12	36	60	120				
32.	Молоко	Молоко- 10% р-р углекис- лого нат- рия Na_2HCO_3	1000	до	слабо- щелоч. реак- ции			7,1- 7,2	" "	Молоко желатель- но осво- бодить отсливок
33.	Лакмусо- вое молоко	Молоко свежее 10% р-р углекис- лого нат- рия $NaHCO_3$ Лакмусо- вая на- стойка	1000	до	слабо щелоч. реак- ции			Не уста- нав- лив.		
			pH 7,1- 7,2	50-100	/5-10%/					
34.	Мясопеп- тонная желатина	Мясопеп- тонный бульон Желатина	1000	3000	5000	10000	7,4		Авто- клав. ется при $110^{\circ}C$ 20 мин. Осажда- ется (1 бел. на 1 л.) Разлива- ется по 9-10мл.	
			100- 150	300- 400	500- 700	1000				

III.

3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОЛИ-ПАРАТИЗОЗНОЙ ГРУППЫ БАКТЕРИЙ.

35.	Среда Кауфмана	Бычья желчь (стериль- ная) Среда Моллера Водный р-р бриллиантовой зелени /1:1000/	50	150	250	500		Не уста- нав- лив	Стерил. авток. цвет при $110^{\circ}C$ 30 мин. Среды зелено- ватой, после - зелено- вато- корич- невый.
			1000	3000	5000	10000			
			10	30	50	100			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
36.	Среда Маллери	Мел химич. чистый CaCO_3 МПБ (рН 7,6) <u>I. р-р</u> <u>гипосульфита:</u> 1) кристалл. гипосульфит $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2) дистил. вода П. Р-р Лип-голя: 1) кристалл. йод 2) водистый калий KI 3) дистил. вода	4,5	13,5	22,5	45	Не уста-навля. при 115°C 30 мин. I-рр стерилиз. в автоклав. Кола	Авто-клав. при 115°C 30 мин. I-рр стерилиз. в автоклав. Кола	Колбу с мелом стерил. сухим жаром, затем добавл. МПБ Гипосульфит и р-р йода до бавляют перед употреблением
37.	Среда Киллиана	МПБ (стерильный) рН = 6,7-6,9 0,1% водный р-р бриллиантовой зелени	1000	3000	5000	10000			Р-р бриллиантовой зелени добавл. непосредственно перед употреблением из расчета I:10000 I:150000 на 100мл МПБ
38.	Селени-товая среда	Пептон Натрий фосфорно-кислый двузамещ. Na_2HPO_4 Натрий фосф. кислый однозамещ. NaH_2PO_4 Лактоза Дистил. вода Натрий селенитово-кислый однозамещенный	5	16	25	50	Не уста-навля. при 115°C 30 мин.	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Перед употребл. впробир. добавл. 0,2 мл селени-то-кисл. натр. 10% р-р

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
39. Среда В.Л. Шига-нова и Г.П. Кали-на (для накопле-ния сады-монелл)	1. Пептон	8,4	25,2	42	84	Не уста-нав.	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	После рас-творения ингриди-ентов 1, 2, 3 р-ров, их соединя-ют, разли-вают по пробир-кам				
	Натрий хлористый	14,3	42,9	71,5	143							
	Дрожжевой диализат	18	54	90	180							
	Фосфорно-кисл. калий одно-земещ. KH_2PO_4	2,85	8,55	142,5	285							
	Дистилл. вода	890	2670	4450	8900							
	<hr/>											
	2. Магний хлористый кристалл. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	71,4	214,2	357	714							
	Дистилл. вода	900	2700	4500	9000							
	<hr/>											
	3. 0,5% водный р-р бриллианто-вой зелени	1,8	5,4	9	18							
40. Среда Минке (для культи-вирова-ния E. коли с адгезив-ным анти-геном)	Готовятся следующие растворы:								Все р-ры стерилизуются. Вместо казеи-новой от-к-ты можно использовать автокл. фермен-тативный казеино-во-дрож-жевой гидроли-з в аппа-рате Коха. или ги-дролizat лактала-булина (ЛА)			
	1. Буферный раствор:											
	Калий фос-фор.-кисл. одноземещ. KH_2PO_4	2,72	7,5									
	Натрий фосф.-кисл. двуземещ. Na_2HPO_4	20,2										
	Вода дистилл.	до 1000										
	2. Р-р микроэлементов:											
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10,0										
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,0										
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,135										
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,4										
Вода дистилл.	до 1000											

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

3. Р-р казеиновой к-ты (ФКДГ, ГЛА)

Казеино-
вая к-та
(ФКДГ, ГЛА) 5

Вода
дистилл. 100

4. Р-р глюкозы:

Глюкоза 5

Вода
дистилл. 100

5. Агар-агар ("Дифко"):

Агар-агар 26

Вода
дистилл. 1000

Порядок приготовления: После стерилизации растворы в стерильных условиях соединяют в заданных количествах среды: 1 мл р-ра микроэлементов + 500 мл буферного р-ра (+50°C) + 20 мл р-ра казеиновой к-ты (ФКДГ, ГЛА) + 20 мл р-ра глюкозы + 460 мл агара (+50°C).

41. Магниева среда	а) пептон натрий хлористый	4,2	12,6	21	42	Не уста-навл. при 112°C 20 мин, прибавляют раство-ры "б" и "в".
	Калий фосф. кислый одно-замещ. KH_2PO_4	7,0	21	35	70	
	Дрожжевой экстракт	1,5	4,5	7,5	15	
	Вода дистилл.	10	30	50	100	
	Вода дистилл.	890	2670	4450	8900	
	б) Магний хлор. кристалл. ($Mg Cl_2$)	36	108	180	360	
	Вода дистилл.	90	270	450	900	
	в) 0,1%-я водный р-р бриллиантовой зелени	5	15	25	50	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАМПИЛОБАКТЕРИЙ.									
42.	Полужидкий агар по ВГНКИ (0,15-0,2% агара)	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	7,3	Автоклав. при 115°C 30мин	
		Мясная вода	250	750	1250	2500			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	2	6	10	20			
		Аминопептид	50	150	250	500			
43.	Твердый агар по ВГНКИ (2,5% агара)	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	-"	-"	
		Мясная вода	250	750	1250	2500			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	25	75	125	250			
		Аминопептид	50	150	250	500			
44.	Полужидкий агар по ВГНКИ с 1% глицина	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	7,3	Автоклав. при 115°C 30мин	
		Мясная вода	250	750	1250	2500			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Глицин	10	30	50	100			
		Агар-агар	2	6	10	20			
45.	Полужидкий агар по ВГНКИ с 3,5% натрия хлористого	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	-"	-"	
		Мясная вода	250	750	1250	2500			
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	35	105	175	350			
		Агар-агар	2	6	10	20			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									дистилл. водой, фильтруют через 2 слоя марли. Разливают по колбам стерилиз. автоклав. 121°С 30-40 минут

5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВРУЦЕЛЛ.

50.	Мясо-пептонный печеночно-глицериновый агар (МППГА)	Печеночная вода Мясная вода Пептон Натрий хлористый Глицерин Глюкоза Агар-агар	500 500 10 5 20 10 20	1500 1500 30 15 60 30 60	2500 2500 50 25 100 50 100	5000 5000 100 50 200 100 200	7,4-7,5	Автоклав. при 115°С 30мин	Осаждает белком (1 белок на 1 л)
-----	--	--	---	--	--	--	---------	---------------------------	----------------------------------

51.	Мясо-пептонный печеночный-глицериновый бульон (МППГБ)	Готовится также, как МППГА, но без добавления агара						-"	
-----	---	---	--	--	--	--	--	----	--

52.	Агар Альбины	Дистилл. вода Дрожжевой экстракт Пептон Натрий хлористый Бисульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ Агар-агар Глюкоза	1000 20 20 5 0,1 30 1	3000 60 60 15 0,3 90 3	5000 100 100 25 0,5 150 5	10000 200 200 50 1 300 10	7,2-7,3	Автоклав. при 115°С 30мин	Глюкоза и бисульфат натрия добавл. перед разливом
-----	--------------	---	---	--	---	---	---------	---------------------------	---

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
53.	Среда Вейбриджа	Дистилл. вода	835	2502	4175	8350	7,8	Авто-клав при 115°C 30мин	Усаждает-ся личным белком (1 белок на 1 л) фильтрует через ватно-марлевый фильтр	
		Мясная вода	165	495	825	1650				
		Пептон	10	30	50	100				
		Натрий хлористый	5	15	25	50				
		Глюкоза	10	30	50	100				
		Агар-агар	30	90	150	300				
54.	Агар "Д"	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000	7,2	Авто-клав при 115°C 30мин	В агар для флаконов, матрисов добавляют 0,5% агара для увеличения плотности	
		Сухой питательный агар "Д"	50	150	250	500				
		Глицерин	20	60	100	200				
		Глюкоза	10	30	50	100				
55.	Печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГА)	Печеночная вода	1000	3000	5000	10000	7,2	Авто-клав при 115°C 30мин		
		Пептон	10	30	50	100				
		Натрий хлористый	5	15	25	50				
		Агар-агар	25	75	125	250				
		Глюкоза	10	30	50	100				
		Глицерин	20	60	100	200				
56.	Печеночно-глюкозно-глицериновый бульон (ПГВ)	Готовится аналогично ПГА, но без добав. агара						"-"	"-"	
57.	Картофельный агар	см. стр.25					7,2			
58.	Сывороточно-декстрозный агар	Дистилл. вода	835	2505	4175	8350	7,8	Авто-клав при 115°C 30мин	Перед употребл сыворотку КРС или лошади 10% к р-р декстрозы. 1% про-фильтрован. че-рез филь-тры Зейтца	
		Пептон	10	30	50	100				
		Натрий хлористый	5	15	25	50				
		Мясная вода	165	495	825	1650				
		Агар-агар	20	60	100	200				
		Глюкоза или декстроза	10	30	50	100				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
59.	Плотный печеночно-сырочный и печеночно-аминопептидный агар	Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Агар-агар Сода двууглекислая 20% р-р Глюкоза Глицерин	1000 10 5 20 17 10 20	3000 30 15 60 51 30 60	5000 50 25 100 85 50 100	10000 100 50 200 170 100 200	7,2 при 115°С 30 мин	Автоклав. 115°С 30 мин	Перед употреблением добав. сыворотку КРС 10-20% или 10-15% аминокептида.

60.	Полужидкий печеночно-сырочный и печеночно-аминопептидный агар	Готовится так же, как плотная Агар-агара добавля. 1,5-2 г					- "	- "	- "
-----	---	---	--	--	--	--	-----	-----	-----

61.	Эритрит агар	Готовая питательная среда для выделения бруцелл.							
-----	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--

6. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ.

62.	Картефельный бульон	Водопроводная вода Картофель очищенный Пептон Натрия хлористый Глицерин Глюкоза	1100 500 10 5 30 10	3300 1500 30 15 90 30	5500 2500 50 25 150 50	11000 5000 100 50 300 100	7,0	Автоклав. 115°С 30 мин	
63.	Среда Петтрам - Ави	Из расчета на 1 литр Молоко Крахмал Пептон Клубни картофеля Глицерин Малахитовая зелень 2% р-р водный Цельные яйца	300 12 2 2шт 24 20 8 шт	600 24 4 4 шт 48 40 16 шт				Не устанавливается	В аппарате для свертыван. сывороток при 85°С 40 мин. 2 дня.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
64.	Среда Френсиса	Мясная вода Пептон Натрий хлористый Глицерин	1000 40	3000 120	5000 200	10000 400	7,4	Авто-клав. 115°C 30мин	
65.	4% глицириновая вода	Дистилл. вода Глицерин	1000 40	3000 120	5000 200	10000 400	7,2	Авто-клав. 110°C	
66.	Картофельная среда Павловского	В пробирки РУ наливаются 4% глицириновая вода (рН=7,0) и кладется резанный кусочком, предварительно выдержанный в течение часа в 10% растворе соды.						текущим паром 20 минут, автоклавированием при 110°C 5-7 минут	
67.	Среда Левенштейна-Йенсена	Дистилл. вода Сернокислая магнезия $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Лимоннокислая магнезия $MgC_6H_5O_7$ Аспарагин Глицерин Крахмал Малахитовая зелень водный р-р 2% Калий фосфорнокислый однозамещен. (KH_2PO_4) Яичная масса	600 0,24 0,6 3,6 12 30 20	1800 0,72 1,8 10,8 36 90 60	3000 1,2 3,0 18 60 150 100	6000 2,4 6,0 36 120 300 24	В аппарате свертыв. сыворотки при 85°C 40 мин 2 дня	Смесь перемешивается со стеклянными бусами	
68.	Полужидкая среда на основе полу-синтет. среды Школьникавой (для культуры микробактерий)	Калий фосфорнокислый однозамещ. KH_2PO_4 Натрий фосфорнокислый двузамещен. Na_2HPO_4 Сернокислый магниевый ($MgSO_4$)	1,5	4,5	7,5	15	Не авто-установка. 120°C 30мин	За 3 дня перед употреблением на 700 мл среды-100мл 20% сахарозы и 100мл сыв-ки КРС	

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Лимонно-кисл. натрий $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,5	4,5	7,5		15			
		Лимонно-кислое аммиачное железо $\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,05	0,15	0,25		0,5			
		L-аспарагин	1	3	5		10			
		Глицерин	30	90	150		300			
69. Среда Гельберга		Яйца целые	6 шт					Не В ап-уста-парате навл. для	Перемешивается в колбе с бусами, разлив по пробиркам	
		Желтки	4 шт					сверт. сыво-роток при 85°		
		Молоко	100					40 мин		
		Картофельный отвар	100					2 дня		
		Солевой р-р стерил.	100							
		Малахитовая зелень 2% водный р-р	7,5							
		Солевой р-р:								
		Калий фосф. кислый двузамещ. K_2HPO_4	1	3	5		10		Соле-вой р-р	Разли-вают во флаконч по 110 мл.
		Натрий лимонно-кислый $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	3	5		10		рилизу-ют: до-водят авто-клав до 120°	
		Магний сернокислый $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	3	5		10		и вы-ключ.	
		Пептон	6	18	30		60			
		Глицерин	30	90	150		300			
		Вода дистилл.	1000	3000	5000		10000			
		Картофель-ный отвар	1 кг картофеля кипятят в 2л дистилл. воды 15 мин. Отстаивают и верхний слой фильтруют через ватно-марл. фильтр. Разливают во флаконы по 110 мл.							
		Молоко	Молоко центрифугируют или предварит. отстаивают в холодильнике, снимают сливки, фильтруют через ватно-марл. фильтр, разливают по 110 мл во флаконы. Стерилизуют в автоклаве паром при 1 атм 10 мин, или в аппарате Коха 2 дня текущим паром, 30-40 мин.							

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
70. Среда Калфина	Желтки яичные	150	450	600	1500	8,2	30мин теку- чим паром	Перед до- бавлением малахит. зелени подсвещ. 5% KOH до светло- зеленой окраски (8,2)	
	Глицерин	7	21	35	70				
	Картофель- ный отвар:	1/2 картоф. клубня натереть на терке + 200 мл дистилл. воды, подщелачивает р-ром бромтимол-блау до зеленой окраски.							
	Картофель- ный отвар	50	150	250	500				
	Натрий фос- форнокислый двузамещ. 10% р-р Na_2HPO_4	20	60	100	200				
	Магний серно- кислый 10% р-р $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	6	10	20				
	Малахитовая зелень 1% водный р-р	20	60	100	200				
	Дистилл. вода	750	2250	3750	7500				
71. Среда Шула	Натрий фосф. кислый двузамещ. Na_2HPO_4	1,25	3,75	6,25	12,5		Не уста- навл. 120°C 30мин	Авто- клав, при	
	Калий фос- форн. кисл. однозамещ. KH_2PO_4	0,75	2,25	3,75	7,5				
	Магний сернокисл. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15	0,45	0,75	1,5				
	Натрия цитрат $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,25	3,75	6,25	12,5				
	Ферроаммо- ний цитрат $\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,025	0,075	0,125	0,25				
	Казеина гидролизат 10% водный раствор	25	75	125	250				
	Глицерин	15	45	75	150				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Малахитовая зелень 2% водный раствор	1	3	5	10			
		Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000			
72. Среда финн-II		I Яичная масса	12 яиц					Не уста-навля.	Авто-клав при 120°C 20мин
		II Солевой р-р:							
		Магний сернокислый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5						
		Натрия цитрат $Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	1						
		Квасцы железосамичные $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,05						
		Калий фосф. кислый однозамещ. K_2HPO_4	20						
		Аммоний цитрат однозамещ. $NH_4C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	5						
		Натрий глутаминовокислый однозамещ.	10						
		Глицерин	20						
		Дистилл. вода	до 1л						
73. Среда Сотона		Аспарагин	5	15	25	50	7,2	Авто-клав при 120°C 20мин	
		Глицерин	50	150	250	500			
		Лимонная к-та $C_6H_8C_7H_2O$	4	12	20	40			
		Калий фосф. кисл. двузамещ. K_2HPO_4	5	15	25	50			
		Магний сернокислый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	1,5	2,5	5			
		Железо сернокислое $Fe_2(SO_4)_3$	0,05	0,15	0,25	0,5			
		Аммоний цитрат двузамещ. $(NH_4)_2C_6H_5O_7$	2	6	10	20			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Цинк серно-кислый ZnSO ₄	0,1	0,3	0,5		I		
		Вода дистилл.	до 1 л						
74.	Среда Гарольда	Пептон	9				7,5	Авто-клав при 120°C 25мин	Микобактерии добавляются после установления по шкалам
		Натрий хлористый	4,5						
		Агар-агар	15,3						
		Мясной экстракт	2,7						
		Микобактерии	27						
		Яичные желтки	6 шт.						
		Малахитовая зелень 2% водный раствор	5,1						
		Дистилл. вода	870						

7. СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ.

75.	Бульон Мартена	Пептон Мартена	500	1500	2500	5000	8,2	Авто-клав при 115°C 30мин	Фильтруется через бумажный фильтр
		Мясная вода	500	1500	2500	5000			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
76.	Агар Мартена	Пептон Мартена	500	1500	2500	5000		"	
		Мясная вода	500	1500	2500	5000			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	30	90	150	300			
77.	Бульон Эдвара	Водопроводн. вода	500	1500	2500	5000	8,4	Авто-клав при 115°C 30мин	Осаждаются (белок на 1 л) Фильтр. через ватно-марлевый фильтр
		Сердечная вода	500	1500	2500	5000			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
78.	Бульон из пер-вара бычьего сердца	Гидролизат бычьего сердца (ам. азот не менее 600мг%)	200	600	1000	2000	7,8	"	
		Мясная вода	400	1200	2000	4000			
		Водопр. вода	400	1200	2000	4000			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
79.	Среда на основе ферментативного млечного гидролизата на р-ре Хенкса для культивирования микоплазм из культур клеток (подушчатая)	<p>ФГМ-С Дистилл. вода</p> <p>Р-р Хенкса: KCl CaCl₂ · 2H₂O MgSO₄ · 7H₂O NaHCO₃ MgCl₂ · 6H₂O NH₄ · H₂PO₄ · 2H₂O Глюкоза Агар "Дифко"</p>	<p>20 1000</p> <p>60 3000</p> <p>100 5000</p> <p>200 10000</p>	<p>8,0 0,4 0,185 0,2 0,35 0,1 0,06 1,0 3</p>	<p>24 1,2 0,56 0,6 1,05 0,3 0,18 3,0 9</p>	<p>40 2 0,97 1,0 1,75 0,5 0,3 5,0 15</p>	<p>80 4 1,85 2,0 3,5 1,0 0,6 10,0 30</p>	<p>8,0 8,2</p>	<p>Перед употреблением добавляют дрожжевой экстракт (10%) и сыворотку КРС или лошади (10-20%).</p> <p>Автоклав. при 115°C 30 мин.</p>
80.	0,3% агар из перевара бычьего сердца	Бульон из перевара бычьего сердца Агар-агар	1000 3	3000 9	5000 15	10000 30		7,8	Автоклав. при 110°C 30 мин.
81.	2% агар из перевара бычьего сердца	Бульон из перевара бычьего сердца Агар-агар	1000 20	3000 60	5000 100	10000 200		"-"	Можно просветлить белком куриного яйца-1 белок на 1 л среды
82.	Среда Хейфлика	<p>Агар "Дифко" 1,5-2%</p> <p>Сыв-ка крови лошади инактивированная</p> <p>Дрожжевой экстракт 250 р-р</p>	700 200 100	2100 600 300	3500 1000 500	7000 2000 1000	8,0	Автоклав. при 115°C 30 мин.	Сыворотку добавляют после стерилизации
83.	Среда ВЛЭВ	<p>Пептон Мартена</p> <p>Мясная вода</p>	500 500	1500 1500	2500 2500	5000 5000	8,0	Автоклав. при 120°C 30 мин.	Перед употреблением добавляют 20% стерил. сыв-ки и 10% дрож. экстракта.
84.	Плотная среда ВЛЭВ	<p>Пептон Мартена</p> <p>Мясная вода</p> <p>Агар-агар</p>	500 500 20	1500 1500 60	2500 2500 100	5000 5000 200	"-"	"-"	"-"

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
85.	Среда Г.Н.С., И.Погани	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	8,0- 8,2 при 120°C 30мин	Авто- клав, при 120°C 30мин	Перед употребл. добавляют 20% стер сыр-ки и 10% дрож. экстракта
		Натрий хлористый	2,5	7,5	12,5	25			
		Натрий фос- форно-кисл. двузамещ. № ₂ НРО ₄	2,5	7,5	12,5	25			
		Фенол-рот	0,024	0,072	0,12	0,24			
		Пептон	0,075	0,225	0,375	0,75			
		Дрожжевой экстракт	200	600	1000	2000			
		Сыв-ка кро- ви лошади	200	600	1000	2000			
86.	Среда Л.Штип- кович	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	6,7- 7,8	Авто- клав, при 115°C 30мин	— — —
		Бакто-агар с триптозой	20	60	100	200			
		Мальтоза	25	75	125	250			
		Натрий хлористый	5	15	25	60			
		Натрий фосф. кисл. двузам. № ₂ НРО ₄	2,5	7,5	12,5	25			
		Фенол-рот	0,024	0,072	0,12	0,24			
		Дрожжевой экстракт	10	30	50	100			
87.	Среда Р.Р.Чал- квиста	Бульон "Дифко" (ПДЛО)	22,5	67,5	112,5	225	8,0	— — —	— — —
		Глюкоза	10	30	50	100			
		Дифосфопи- ридинукле- отид	0,02	0,06	0,1	0,2			
		Цистеин гидрохло- рид	20	60	100	200			
		Фенол-рот	50	150	250	500			
		Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ.									
88. Среда Чапека	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000		Не установлена.		Глюкоза добавляется после кипячения. Фильтруется через бумажные фильтры
	Азотно-кислый натрий NaNO_3	2	6	10	20	Автоклав при 115°C 30 мин.			
	Калий фосф. кисл. однозамещ. K_2PO_4	1	3	5	10				
	Сернокислый магний $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	1,5	2,5	5				
	Калий хлористый KCl	0,5	1,5	2,5	5				
	Глюкоза	30	90	150	300				
89. Агар Чапека	Жидкая среда Чапека	1000	3000	5000	10000		---		Глюкоза добавл. после кипячения. Не осажда-ется. Фильтруется через ватно-марл. фильтр
	Агар-агар	25	75	125	250		Автоклав, при 115°C 30 мин.		
90. Сусло-агар	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000		7,8 клав при 110°C 30 мин		При разливе в матрасы (спелзает) добавляется 2% агара
	Сусло	500	1500	2500	5000				
	Агар-агар	25	75	125	250				
91. Сусло-агар с пептоном	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000		---	---	---
	Сусло	500	1500	2500	5000				
	Агар-агар	25	75	125	250				
	Пептон	5	15	25	50				
92. Сусло-агар с ферментативным гидролизатом мыши (ЭГМ-С)	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000		---	---	---
	Сусло	500	1500	2500	5000				
	Агар-агар	25	75	125	250				
	ЭГМ-С	5	15	25	50				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
93.	Сусло-агар с ферментативным казеиновом-дрожжевым гидролизатом (ЖДГ)	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	7,8	Авто-клав при 110°C 30мин	При разливе в матрасы (используются) агара добавляется 3%
		Сусло	500	1500	2500	5000			
94.	Среда Сабуро	Агар-агар	25	75	125	250	6,2	Авто-клав при 115°C 30мин	
		ЖДГ	5	15	25	50			
		Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000			
		Пептон	10	30	50	100			
95	Картофельный агар	Мальтоза (глюкоза)	40	120	200	400	Не уста-мал.	Авто-клав при 115°C 30мин	
		Агар-агар	18	54	90	180			
		Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000			
		Очищенный картофель	200	600	1000	2000			
96.	Среда Ван-Интэрсона	Агар-агар	20	60	100	200	"-	"-	
		Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000			
		Аммоний азотно-кислый NH_4NO_3	0,5	1,5	2,5	5,0			
		Калий фосф. кислый однозамещ. KH_2PO_4	0,5	1,5	2,5	5,0			

9. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ.

97.	Среда Петровского (для культуры вириданки и трихомонады)	Водопроводная вода	750	2250	3750	7500	7,7	Авто-клав при 115°C 30мин	Разливаются в пробирки по 9 мл под вакуумом и инокулируются маслом.
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		мальтоза	10	30	50	100			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
98.	Среда Сумцова-Манжос для культивирования балантидий	Дистилл. вода Натрий хлористый Натрий фосф. кислый двузамещ. Na_2HPO_4 Калий фосф.-кислый однозамещ. KH_2PO_4	1000	3000	5000	10000		Не устанавливал.	
			7	21	35	70			
			1	3	5	10			
			0,4	1,2	2	4			

Порядок приготовления.

Раствор стерилизуется кипячением 15 мин., дважды фильтруется через фильтровальную бумагу, после фильтрации объем доводится до первоначального, затем разливается в пробирки по 8 мл, в каждую пробирку добавляют рисовый крахмал на кончике ножа, после чего стерилизуют при 121°C 30 мин. Непосредственно перед посевом в пробирки, которые должны храниться при +4°C в стерильных условиях добавляют по 0,2 мл дистиллированной оболочки тодстого отдела кишечника свиней или по 1 мл ФДС.

99.	Питательная среда для изоляции и культивирования трепонем	Гидролизат Хот-тингера (130-140 мг% ам. аз)	2/3 объема сосуда	7,0-7,2	Устанавливал.	Гидролизат готовится из муки сои, гороха или слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Из 3-4 кг поджелудочной железы готовят фарш перемолов его дважды на мясорубке. Бобы сои и гороха размазывают, заливают дистиллированной водой 1:3
		Добавляют по весу:			время барботирования	муку и кипятят 20 мин при постоянном помешивании. После остывания до 40°C 10% NaOH устанавливают pH 7,8-8,0 и вносят в количестве 10% подже-
		Резазурин (индикатор редукции кислорода)	0,001%			
		Натрий хлористый	0,5%			
		Глюкоза	0,25%			
		Пептон	1%			
		Бактерагар "Ди"К"	2%			
		0 редукции кислорода в среде судят по изменению цвета резазурина - от голубого к бесцветному через розовый. К концу кипячения среда должна приобрести естественный цвет (цвет до прибавления резазурина). Затем среду моментально закупоривают стерильной резиновой пробкой, вносят в бокс и пропускать через нее обескислороженный углекислый газ или азот в течение 15 мин. К концу барботирования в среду вносят 0,05% цистеин - гидрхлорида, сосуд моментально закупоривают пробкой и охлаждают в ледяной ванне.				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Среду сохраняют при $T=4^{\circ}\text{C}$. Непосредственно перед применением автоклавируют при 0,5 атм. 30 мин. Перед посевом среду остужают до $45-50^{\circ}\text{C}$, пропуская через нее обескислороженный углекислый газ, вносят 10% дефибринированной крови крупного рогатого скота или барана со спектиномицином (400 мкг/мл), после чего осторожно и тщательно перемешав, разливают в чашки Петри слоем толщиной до 5 мм в атмосфере обескислороженного CO_2 в стерильном боксе. При изготовлении полужидкой среды требуется от 0,25 до 0,45% бактоагара. В остальном процесс приготовления такой же, как описанный выше. Среду хранят при 4°C в течение 1-2 недель. Перед применением полужидкий агар автоклавируют, остужают барботированием до $45-50^{\circ}\text{C}$ добавляют сыворотки теленка или КРС с 400 мкг спектиномицина, разливают в боксе по пробиркам в атмосфере обескислороженного CO_2 или N_2 и закрывают ватно-марлевыми пробками.								лудочно железы и 2% хлорофор- ма. Смесь разливают в стеклян- ные бутыл- ки на 2/3 их объема, плотно закрывают и ставят при 36°C , т.к. при гипролизе и ставят рН смеща- ется в кислую сторону его дово- дят до 7,8-8,0 10%/ным р-ром NaOH через 1,2-3 ч и далее ежеднев- но в те- чение 3-4 су- ток один раз в день. После кращения нараста- ния амин- ного азо- та (300- 400 мг%) бутыли с перева- ром кра- тят при комнат- ной тем- пературе.

I 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ.

100. Среда для культивирования возбудителя копытной гнили овец (для получения биомассы бактерий)	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000	7,6	Автоклав. при 115°C 30мин
	Печеночная вода	500	1500	2500	5000		
	Гидролизат Хоттингера (150 мг % ам. аз.)	200	600	1000	2000		
	Пептон	10	30	50	100		
	Натрий хлористый	5	15	25	50		
	Глюкоза	5	15	25	50		
101. Модифицированная среда Китт-Тарончи с 0,1% агара и кусочками мозга овец	Водопроводная вода	375	1125	1875	3750	8,4	Автоклав. при 110°C 30мин
	Мясная вода	375	1125	1875	3750		
	Печеночная вода	250	750	1250	2500		
	Пептон	10	30	50	100		
	Натрий хлористый	5	15	25	50		
	Агар-агар	1	3	5	10		
						Разливается по пробиркам с кубочками мозга сверху, наливается в резиновое масло.	

См. также среда Китт-Тарончи, рец. № 6 стр. 27

11. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

102. Среда для культивирования коринебактерий (ВИЭВ)	ФКД	20	60	100	200	7,6-7,7	Автоклав. при 120°C 30мин
	Тим-80	0,006	0,018	0,03	0,06		
	Натрий цитрат	0,05	0,15	0,25	0,5		
	$\text{Ca}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$						
	Натрий сукцинат $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	7,5	12,5	25		
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	7,5	12,5	25		
	KH_2PO_4	1,0	3	5	10		
	MgCl_2	5	15	25	50		
	NaHCO_3	0,5	1,5	2,5	5		
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,9	1,5	3		
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,015	0,03	0,05	0,1		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Среда для культивирования коринебактерий (ВИЭВ)	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ $SiSO_4 \cdot 2H_2O$ ЭДТА Вода дистилл.	0,006 0,015 0,015 0,075 0,045 0,005	0,018 0,045 0,045 0,225 0,135 0,015	0,03 0,075 0,075 0,375 0,225 0,025	0,06 0,15 0,15 0,75 0,45 0,05	Не устанавл.		
		1000	3000	5000		10000			

12. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЕМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.

102. Среда для культивирования <i>H. pylori</i> - <i>motilae</i>	6-н Хот-тингера (200мг% ам. аз.) ДН (дифосфогиридинуклеотид) 10мкг/мл Глюкоза $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 мкг/мл	1000	3000	5000		10000	Не устанавл.	Вместо ДН можно взять 10% дрожжевого экстракта
		30	60	150		300		
		4	12	20		40		
		10						

13. Биологический контроль питательных сред.

Тест-штаммы культур их характеристика, порядок хранения и работы (методические рекомендации по физико-химическому и биологическому контролю белковых гидролизатов для бактериологических питательных сред А., 1983).

У. Определение показателей эффективности (Телишевская Л.И. и др. 1983)

Для оценки эффективности питательных сред ВГНМ предлагает определение концентрации микробной взвеси через 24 ч инкубации по показателю оптической плотности (Е) на 43Ке при длине волны 620-640 нм в кювете с рабочей длиной 5 мм (ГОСТ 13305-75). В качестве нижних границ накопления бактериальных клеток могут быть рекомендованы следующие значения Е для тест-культур:

<i>Staphylococcus aureus</i> Лосманов	- 0,4
<i>Escherichia coli</i> 675,0,	- 0,5
<i>Streptococcus faecalis</i> 6783	- 0,3
<i>Streptococcus pyogenes</i> Dick I	- 0,12
<i>Mycella flavescens</i> 18 8516	- 0,15
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 1911	- 0,12

II. РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ВИРУСО-
ЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

В В Е Д Е Н И Е

Для приготовления солевых растворов, на основе которых готовятся питательные среды, берут реактивы квалификации химически чистые (хч) или особой чистоты (ОСЧ). Для этих целей используют деминерализованную (ультрачистую) или бидистиллированную воду.

Контроль за чистотой воды осуществляется на кондуктометре типа ОК 102/1 (производство Венгрия) по величине электропроводности, выраженной в микросименсах - μS или единицах удельного сопротивления, выражаемого в мегомах (Мом).

Для получения ультрачистой воды используют дистиллированную воду, которую рециркулируют через установку "Супер-Кью" или другие аналогичные установки. Контроль за чистотой воды устанавливают по удельному сопротивлению до величины 10-18 Мегом, т.е. высшей технической достижимой степени чистоты.

Таблицы пересчета: электропроводность - удельное сопротивление прилагается.

Соли растворяют в строгой последовательности, указанной в прописи. Последующую соль добавляют только после полного растворения предыдущей. Солевые растворы Хэнкса, Версена, Эрла, Тирода, двууглекислой соды и однозамещенного фосфорнокислого калия стерилизуют автоклавированием при 0,7 атм. 30 мин.

Питательные среды на основе гидролизата лактальбумина (ЛЛА), ферментативного гидролизата мышц (ФГМ-С), ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата (ФДГ), среда Игла и раствор трипсина предварительно фильтруют через 5-10 слоев фильтровальной бумаги, затем через пластины EK5-1 и стерилизуют через пластины СФ, EK5-2 или миллипоровый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Все питательные среды после стерилизации, т.е. стерильной фильтрации для проверки на бактериальную контаминацию помещают в термальную комнату при 37°C на 5 суток, а затем на 10 дней при 16-18°C и после этого срока среды используют.

Раствор трипсина выдерживают в термальной комнате при 37⁰С 1 сутки, затем хранят при температуре 4⁰С в течение месяца или в замороженном состоянии в течение нескольких месяцев.

ТАБЛИЦА ПЕРЕСЧЕТА ПРОВОДИМОСТЬ - СОПРОТИВЛЕНИЕ.

μS (микросимменс)	Ом	Ком	Мом
2000	500	0,5	0,0005
1000	1000	1	0,001
500	2000	2	0,002
200	5000	5	0,005
100	10000	10	0,01
50	20000	20	0,02
25	40000	40	0,04
20	50000	50	0,05
10	100000	100	0,1
5	200000	200	0,2
3,33..	300000	300	0,3
2,5	400000	400	0,4
2,0	500000	500	0,5
1,66..	600000	600	0,6
1,428	700000	700	0,7
1,25	800000	800	0,8
1,11..	900000	900	0,9
1,0	1000000	1000	1
0,5	2000000	2000	2
0,33	3000000	3000	3
0,25	4000000	4000	4
0,2	5000000	5000	5
0,166г.	6000000	6000	6
0,142	7000000	7000	7
0,125	8000000	8000	8
0,11..	9000000	9000	9
0,1	10000000	10000	10
0,05	20000000	20000	20
0,038*	26000000	26000	26

*

I Солевые растворы

№ пп	Назва- ние р-ра	Назва- ние ин- гредиентав	К-во ингредиентов (в г) на объем (в л)			рН до- лизаии	Режим сте- рили- зации	Приме- чание
			1л	5л	10 л			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Раствор Хенкса для при- готовле- ния пи- татель- ных сред	NaCl	8	40	80	7,1-7,0	Автокла- вирован. при 0,5 атм. 30мин без CaCl ₂	
		KCl	0,4	2,0	4			
		CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,14	0,7	1,4			
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,5	1			
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,5	1			
		Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,06	0,3	0,6			
		KH ₂ PO ₄	0,06	0,3	0,6			
		NaHCO ₃	0,0	3	6			
Глюкоза	1	5	10					
Фенол-рот, в/р 0,5%	2мл	10мл	20мл			Или че- рез пла- стины СФ, СФС-2, или мил- липор. фильтр 0,22 мкм		
2.	Раствор Хенкса для про- мывания тканей	NaCl	8,0	40	80	7,0-7,1	Автоклав. при 0,5атм 30 мин	
		KCl	0,4	2,0	4			
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,5	1			
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,5	1			
		Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,06	0,3	0,6			
		KH ₂ PO ₄	0,06	0,3	0,6			
Фенол-рот в/р 0,5%	2мл	10мл	20мл					
3.	Раствор Эрла для приготов- ления питатель- ных сред	NaCl	6,8	34	68	7,1-7,2	Автокла- вир. при 0,5 атм. 30 мин без CaCl ₂	
		KCl	0,4	2	4			
		CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	1	2			
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,5	1			
		NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,125	0,625	1,25			
		NaHCO ₃	2,1	11,0	22			
		Глюкоза	1	5	10			
Фенол-рот в/р 0,5%	2мл	10мл	20мл			и глюкозы или через пластины СФ, СФС-2 или милли- пор. фильтр 0,22 мкм		
4.	Раствор тироде	NaCl	8	40	80	7,2-7,3	Автокла- виров. при 0,5 атм 30 мин или СФ, СФС-2 или мил- липор. фильтр 0,22 мкм	
		KCl	0,2	1,0	2			
		CaCl ₂	0,2	1	2			
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,5	1			
		NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,05	0,25	0,5			
		Глюкоза	1	5	10			
		NaHCO ₃	1	5	10			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	10мл	20мл			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
5.	0,02% р-р Версена (трилонБ)	NaCl KCl $Mg_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ KH_2PO_4 Версен	8 0,2 1,15 0,2 0,2	40 1 5,75 1 1	80 2 11,5 2 2	6,8	Авто-клавир. при 0,7 атм 30мин	Перед работой довести рН р-ра до 7,3-7,4 двууглекислой содой
6.	7,5% р-р соды	$NaHCO_3$	75	375	-	-	Авто-клав. 0,7 атм 30мин	
7.	10% р-р однозамещен. фосфата калия	KH_2PO_4	100	500	-	-	Авто-клав. 0,7 атм 30мин	
8.	0,5% р-р фенол-рота (водорастворимый)	Фенол-рот	0,5 г 100мл	1 г 200мл	1,5 г 300мл			Для получения лучшего роста добавить на кончике скальпеля двууглекислую соду ($NaHCO_3$)
9.	Фосфатно-буферный солевой раствор (2 БР)	NaCl KCl $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $Mg_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ KH_2PO_4	8,0 0,2 0,1 1,42 0,2	40,0 1,0 0,5 7,1 1,0	80,0 2,0 1,0 14,2 2,0	6,8	Авто-клав. при 0,5 атм 30мин	
10.	0,2% р-р трип-сина "дифко" на фосфатном буферном р-ре (2БР)	NaCl KCl $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $Mg_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ KH_2PO_4 Фенол-рот 0,5% Трицин ("дифко") Пенициллин Стрептомицин	8 0,2 0,1 1,42 0,2 2мл 2,5	40 1 0,5 7,1 1 12,5	80 2 1 14,2 2 25,0	6,8	Перед работой довести рН р-ра до 7,4-7,6 двууглекислой содой Предварительная фильтрация через пластину БКС-1. Стерилизация через пласт. СЗ, БКС-2, мидипорвные 0,2 мкм	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ Глюкоза (медицин.) Фенолрот 0,5% Трипсин "Дижко" или Олайнского з-да химреактивов, НПО "Биолар", Латв. ССР	8 0,4 0,06 0,06 1 2мл 2,5 5	40 2 0,3 0,3 5 12,5 25	80 4 0,6 0,6 10 20мл 25 50	6,8	Предварительная фильтрация через пластину ЕКС-1 Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2, или миллипорный фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,4-7,6 двууглекислой содой
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стептомицин 100мг 500мг 1000 мг (1 д.)					

2. Питательные среды.

I.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Хенкса	NaCl KCl CaCl ₂ (безводн.) MgSO ₄ ·7H ₂ O MgCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ Глюкоза Фенол-рот 0,5% Лактальбумин	8 0,4 0,14 0,1 0,1 0,06 0,06 0,6 1 2мл 5	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,3 3 5 10мл 25	80 4 1,4 1 1 0,6 0,6 6 10 20мл 50	7-7,1	Предвар. фильтр. через пластины ЕКС-1. Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2, или миллипорный фильтр 0,22мкм	Перед работой довести pH р-ра до 7,2-7,3 ром двууглекислой соды
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стрептомицин 100мг 500 мг 1000 мг (1 г)					

2.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Эрва	NaCl KCl CaCl ₂ (6/в) MgSO ₄ ·7H ₂ O NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O NaHCO ₃ Глюкоза Фенол-рот 0,5% Лакт	6,8 0,4 0,2 0,1 0,125 1,2 1 2мл 5	34 2 1 0,5 0,625 6 5	68 4 2 1 1,25 12 10 20мл 50	7-7,1	Предварительн. фильтрация через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2, или миллипорный фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,2-7,3 двууглекислой содой
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стептомицин 100мг 500мг 1000 мг (1,0г)					

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	0,3% р-р гидролизата мышечных белков на р-ре Хенкса (ВГМ-С)	NaCl KCl $\text{CaCl}_2 (6/9)$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 NaHCO_3 Глюкоза Фенол-рот 0,5% Гидролизат мышечных белков Пенициллин Стрептомицин	8 0,4 0,14 0,1 0,1 0,06 0,06 0,15 1 2мл 3г 100тыс.ед.	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,75 5 10мл 15г 500тыс.ед.	80 4 1,4 1 1 0,6 0,6 1,5 10 20мл 30г 1млн.ед.	6,7-6,8	Предварительная фильт. через пластины EK5-1 Стерилизация через пластины EK5-2 или миллипоров. фильтр 0,22мкм	Перед работй довести рН р-ра до 7,2-7,3 двух-лекси-дой содой
			100тыс.ед.	500тыс.ед.	1000 мг (1 г)			

№. Название пп питательн. среды	Колич-во ингредиентов (в г) на объем среды (в л)	рН до стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
4 .Питательная среда Игла	Одна упаковка сухой среды Игла состоит из 2-х флаконов, рассчитанных для приготовления 10л. питательной среды. Для приготовления среды Игла необходимо: 1. Растворить содержимое флакона № 1 (смесь аминокислот, витаминов, глюкозы, фенолового красного и неорганических солей), в 1 л деминерализованной воды. 2. Растворить флакон № 2 (натрий двууглекислый в 1л. бидистиллированной воды.) 3. Предварительно профильтровать содержимое флакона № 1 через фильтр EK5-1 и довести объем деминерализованной водой до 8 л. , прилить раствор флакона № 2 и довести содержимое бутылки до 10 л.	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через EK5-1 Стерилизация через пластины СЭ, EK5-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ Глюкоза (медицин.) Фенол-рот 0,5% Трипсин "Дитко" или Олайнского з-да химреактивов, НПО "Биолар", Ялтв. ССР	8 0,4 0,06 0,06 1 2мл 2,5 5	40 2 0,3 0,3 5 12,5 25	80 4 0,6 0,6 10 20мл 25 50	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2, или милли-поровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести рН до 7,4-7,6 двууглекислой содой
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стептомицин 100мг 500мг 1000 мг (1,0г)					

2. Питательные среды.

I.	0,5% гид-ролизат лакталь-бумина на р-ре Хенкса	NaCl KCl CaCl ₂ (безводн.) MgSO ₄ ·7H ₂ O MgCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ Глюкоза Фенол-рот 0,5% Лактальбумин	8 0,4 0,14 0,1 0,1 0,06 0,06 0,6 1 2мл 5	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,3 3 5 10 25 50	80 4 1,4 1 1 0,6 0,6 6 10 20мл 50	7-7,1	Предвар. филь-тр. через пластины ЕКС-1. Стерили-зация через пластины СФ, ЕКС-2 или милли поровый фильтр 0,22мкм.	Перед работой довести рН до 7,2-7,3 р-ром дву-углекис-лой соды
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стрепто-мицин 100мг 500 мг 1000 мг (1 г)					
2.	0,5% гид-ролизат лакталь-бумина на р-ре Эриа	NaCl KCl CaCl ₂ (б/в) MgSO ₄ ·7H ₂ O NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O NaHCO ₃ Глюкоза Фенол-рот 0,5% Лакт	6,8 0,4 0,2 0,1 0,125 1,2 1 2мл 5	34 2 1 0,5 0,625 6 5 10мл 25	68 4 2 1 1,25 12 10 20мл 50	7-7,1	Предвари-тельн. филь-трация че-рез плас-тины ЕКС-1 Стерилиза-ция через пластины СФ, ЕКС-2 или милли-поровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести рН до 7,2-7,3 7,5% двуугле-кислой содой
			Пенициллин 100тыс. ед. 500тыс. ед. 1млн. ед.					
			Стептомицин 100мг 500мг 1000 мг (1,0г)					

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	0,3% р-р гидролизата мышечных белков на р-ре Хенкса (ЖИ-С)	NaCl CaCl_2 (6/р) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 NaHCO_3 Глюкоза Фенол-рот 0,5% Гидролизат мышечных белков Пенициллин Стрептомицин	8 0,4 0,14 0,1 0,1 0,06 0,06 0,15 1 2мл 3г 100тыс.ед. 100мг	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,75 5 10мл 15г 500тыс.ед. 500мг	80 4 1,4 1 1 0,6 1,5 10 30г 1млн.ед. 1000 мг (1 г)	6,7-6,8	Предварительная фильтр. через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины ЕКС-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	Перед работой довести рН р-ра до 7,2-7,3 двукислотной содой

№	Название пп питательн. среды	Колич-во ингредиентов (в г) на объем среды (в л)	рН до стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
4	Питательная среда Игла сухая, (производство Олайнского завода жм-реактивов, НПО "Биодар", Латв.ССР	Одна упаковка сухой среды Игла состоит из 2-х флаконов, рассчитанных для приготовления 10л. питательной среды. Для приготовления среды Игла необходимо: 1. Растворить содержимое флакона № 1 (смесь аминокислот, витаминов, глюкозы, фенолового красного и неорганических солей), в 1 л деминерализованной воды. 2. Растворить флакон № 2 (натрий двууглекислый в 1л. бидистиллированной воды.) 3. Предварительно профильтровать содержимое флакона № 1 через фильтр ЕКС-1 и довести объем деминерализованной водой до 8 л., прилить раствор флакона № 2 и довести содержимое бутылки до 10 л.	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕКС-1 Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	

№ пп	Название питательн. сред'	Название ингредиентов	К-во ингредиентов (в г) на объем воды (в л)			рН до стерм-лизац.	Режим стерилизации
			Лл	Бл	Юл		
5.	Среда Игла MEM	NaCl	6,8	34	68	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через EK5-1 Стерилизация через пластины СЭ, EK5-2 и или мидли-поровый фильтр 0,22 мкм
		KCl	0,4	2	4		
		CaCl ₂ б/в	0,2	1	2		
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	1	2		
		NaN ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15	0,75	1,5		
		NaHCO ₃	2	10	20		
		Глюкоза	1	5	10		
		Аргинин	0,105	0,525	1,05		
		Гистидин	0,031	0,155	0,31		
		Изолейцин	0,052	0,260	0,52		
		Лейцин	0,052	0,26	0,52		
		Лизин	0,058	0,29	0,58		
		Фениланин	0,032	0,16	0,32		
		Треонин	0,048	0,249	0,48		
		Триптофан	0,01	0,05	0,1		
		Валин:	0,046	0,23	0,46		
		Цистин	0,024	0,12	0,24		
		Метионин	0,015	0,075	0,15		
		Тирозин	0,036	0,18	0,36		
		Глутамин	0,292	1,46	2,92		
Тиамин	0,001	0,005	0,01				
Рибофлавин	0,0001	0,0005	0,001				
Холинхлорид	0,001	0,005	0,01				
Пантотенат кальция	0,001	0,005	0,01				
Инозит	0,002	0,01	0,02				
Фолиевая к-та	0,001	0,005	0,01				
Никотинамид	0,001	0,005	0,01				
Пиридоксаль	0,001	0,005	0,01				

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6.	0,5% ферментативный казеиновый дрожжевой гидролизат (ФКДГ) на р-ре Хенкса	NaCl KCl CaCl ₂ б/в MgSO ₄ ·7H ₂ O MgCl ₂ ·2H ₂ O Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ Na ₂ HCO ₃ Глюкоза	8 0,4 0,4 0,1 0,1 0,06 0,06 0,6 1	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,3 3 5	80 4 1,1 1 1 0,6 0,6 6 10	7,1-7,2		Перед работой довести рН до 7,2-7,3 7,5% р-ром двууглекислой соды
		Фенол-рот 0,5%	2 мл	10 мл	20 мл			
		ФКДГ	5	25	50			
		Пенициллин	100 тыс. ед.	500 тыс. ед.	1 млн. ед.			
		Стрептомицин	100 мг	5% мг	1000 мг (1 г)			

Солевой р-р (1 л) и навеску ФКДГ, разведенную в 1 л деминерализованной воды предварительно отдельно фильтруют через ЕКЗ -1, затем их смешивают, доводят до 10 л деминерализованной водой и стерилизуют через пластины СФ, ЕКЗ -2 или миллипоровый фильтр 0,22 мкм.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
7.	Готовая	NaCl	6,8	34	68	6,7		
	пита-	KCl	0,4	2	4			
	тель-	CaCl ₂ б/в	0,2	1	2			
	ная сре-	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,163	0,815	1,63			
	да на ос-	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	1	2			
	нове	Глюкоза	1	5	10			
	ФГМ-С на	Феноловый						
	р-ре	красный						
	Эрла с	водный						
	вита-	р-р	0,01	0,05	0,1			
	минами	пенициллин	100мг	500мг	1000мг			
	без глу-	Стрептоми-						
	тамина	цин	100мг	500мг	1000мг			
	(0,125%	Холинохло-						
	или 0,25%)	рид	0,001	0,005	0,01			
	Производ-	Фолиевая						
	ство Пок-	кислота	0,001	0,005	0,01			
	ровского	Инозит	0,004	0,02	0,04			
	завода	Никотин-						
	биопрепа-	амид	0,001	0,005	0,01			
	ратов	Госагропрома СССР						
	г.Покров	-пантоте-						
	Владимир-	нат каль-						
	ской об-	ция	0,001	0,005	0,01			
	ласти.	Витамин В ₆	0,001	0,005	0,01			
		Витамин В ₁	0,001	0,005	0,01			
		ФГМ-0,25%	2,5	12,5	25			
		или 0,125	1,25	6,25	12,5			

1	2	3	4	5	6	7	8	9
№	Название питательн. среды	К-во ингредиентов в гр. на объем среды в литрах	после культивирования клеток среды (кондиционированные) сливают в бутылки емк. 3-5 л. и хранят в холодильнике при 4°С и добавляют к ним следующие ингредиенты: (срок хранения - 2-е недели)	рН до стерилизации	Режим стерилизации	Применение		
8.	Кондиционированные среды: Игла ГЛА и среда 199	Использованные после культивирования клеток среды (кондиционированные) сливают в бутылки емк. 3-5 л. и хранят в холодильнике при 4°С и добавляют к ним следующие ингредиенты: 1. Глюкоза - 1г/л 2. Витамин В ₆ (тиаминбромид) - 0,001 г/л 3. Глютамин - 0,3 г/л 4. NaHCO ₃ - (7,5%) до рН среды 7,2-7,3	использованные после культивирования клеток среды (кондиционированные) сливают в бутылки емк. 3-5 л. и хранят в холодильнике при 4°С и добавляют к ним следующие ингредиенты: (срок хранения - 2-е недели)	6,5-6,7	Приготовленные среды стерилизуют через пластины СФ, ЕКС-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм			
9.	Питательная среда 199, сухая "Дифко"	Один флакон сухой среды 199, содержащий 100г порошка растворяют в 3 л воды при постоянном помешивании. Доводят раствор до 37°С до полного растворения порошка и доливают деминерализованной воды до 10л, затем рН раствора доводят до 7,2-7,4, добавляя 35 мл 10% раствора бикарбоната или 3,5 г сухого бикарбоната натрия.	Один флакон сухой среды 199, содержащий 100г порошка растворяют в 3 л воды при постоянном помешивании. Доводят раствор до 37°С до полного растворения порошка и доливают деминерализованной воды до 10л, затем рН раствора доводят до 7,2-7,4, добавляя 35 мл 10% раствора бикарбоната или 3,5 г сухого бикарбоната натрия.	7,7-7,4	Стерилизация через пластины СФ, ЕКС-2, или миллипоровый фильтр 0,22 мкм			

VII. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, РАСТВОРОВ.

Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве.

Основные правила работы с автоклавом. Стерилизационную камеру автоклава загружают стерилизуемым материалом, затем в водопаровую камеру наливают воду. Крышку автоклава привинчивают болтами к корпусу: болты завинчивают попарно, крест-накрест. Затем открывают конденсационный и выпускной краны и включают источник обогрева. При закипании воды из выпускного крана начинает выходить вытесняемый паром воздух, вначале отдельными порциями, затем непрерывной струей, что означает полное вытеснение из стерилизационной камеры воздуха. После этого кран закрывают и в котле начинается постепенное повышение давления. Началом стерилизации считается тот момент, когда стрелка манометра показывает заданное давление. После этого интенсивность подогрева уменьшают, для того, чтобы давление в автоклаве в течение нужного времени оставалось на одном уровне. По окончании срока стерилизации прекращают подогревание и продолжают наблюдать за стрелкой манометра до тех пор, пока стрелка не упадет до нуля, затем открывают пароотводный кран, а после выхода всего пара - крышку.

Соотношение показаний манометра и температуры кипения воды

Показания манометра (атмосферы)	Температура кипения воды в
0	100
0,2	105
0,4	110
0,5	112
0,6	114
0,7	116
0,8	117
0,9	119
1	121
1,5	127
2	134

Температура и продолжительность стерилизации определяются качеством стерилизуемого материала и составом питательных сред.

Контроль температуры в стерилизационной камере осуществляется с помощью порошкообразных химических веществ - индикаторов, имеющих определенную температуру плавления.

Показатели температуры плавления порошков-индикаторов

Название химического вещества-индикатора	Температура плавления в °C	Примечание
Бензонафтол	110	На 100 г порошка-индикатора прибавляется
Антипирин	115	0,01 г фуксина или метиленовой сини.
Серный цвет	115	
Резорцин чистый	118	
Бензойная кислота	121	

Запаянные ампулы с порошками, смешанными с небольшим количеством краски (метиленовая синь, фуксин, сафранин), помещают в камеру со стерилизационным материалом. При достижении в камере определенной температуры порошки плавятся, образуя сплавы, окрашенные в цвет добавленной краски.

Стерилизация текучим паром. Стерилизация текучим паром производится в текучепаровом аппарате Коха или в автоклаве при независимой крышке и открытом выпускном кране. Стерилизацию текучим паром следует проводить повторно, так как однократное прогревание при температуре 100°C не обеспечивает полного обеспложивания (дробная стерилизация): обработку стерилизуемого материала текучим паром проводят по 30 минут ежедневно в течение 3-х дней. В промежутках между стерилизациями материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях.

Тиндализация - дробная стерилизация с применением температуры ниже 100°C, предложенная Тиндалем. Прогревание стерилизуемого материала производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу при температуре 60-65°C в течение 5 дней при 70-80°C в течение 3-х дней. В промежутках между прогреваниями обрабатываемый материал выдерживают при температуре 25-37°C для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях. Тиндализацией пользуются для обеспложивания питательных сред, свойства которых изменяются под действием высокой температуры.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Практикум по ветеринарной микробиологии. В.А.Байрак, В.М.Беляев, С.С.Гительсон и др. - М.:Колос, 1980.
2. Готтшлак Г. Метаболизм бактерий. - М.:Мир, 1982.
3. Джавец Э., Мельник Дж.Л., Эдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии: Пер.с англ. - М.:Медицина, 1980.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических методов исследования. - М.: Медицина, 1968; 1980.
5. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - М.: Мир, 1978.
6. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология. - М.:Медицина, 1981.
7. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней(под общ.ред.К.И.Матвеева) - М.:Медицина, 1973.
8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования(под ред.М.О.Биргера) - М.:Медицина, 1982.
9. Стейниер Р., Эдельберг Э., Инграм Дж. Мир микробов: в 3 т. М.: Мир, 1979, т.1
10. Телишевская Л.Я., Простяков А.П., Цыганкова С.И., Трусова Л.И. Контроль и стандартизация компонентов и питательных сред бактериальных культур. - Вуллетень ВИЭВ, вып.49. - М.:ВИЭВ, 1983.
11. Методические рекомендации по физико-химическому и биологическому контролю белковых гидролизатов для бактериологических питательных сред (Простяков А.П., Рогожин С.П., Фоменко А.С. и др.) МСХ СССР, ВНИИТИБП, ВГНИ ветпрепаратов МСХ СССР. М., 1983.
12. ГОСТ 20729-75 Питательные среды. Вода мясная (для ветеринарных целей).
13. Методические рекомендации к контролю питательных сред по параметрам роста микроорганизмов в процессе их культивирования. - Исаева З.А. Васнакьян И.А., Запорожцев Л.В. и др. Министерство здравоохранения СССР. Главное управление по производству бактериальных и вирусных препаратов. М., 1980.
14. Методические рекомендации по выделению и культивированию трепонем от свиней, больных дизентерией. М., 1983
15. Методическое руководство по приготовлению и контролю бактериологических питательных сред. Тбилиси, 1977.
16. Анджапаридзе О.Г. с соавт. Культура ткани в вирусологических исследованиях. - М.:Медицина, 1962.
17. Голубев Д.В. с соавт. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. - Л.: Медицина, 1976.

18. Дьяконов Л. П., Глухов В. Ф., Поздняков А. А. Г. Ф. Денисенко и др.
Культура клеток и тканей животных. Ставрополь, 1980.
19. Сергеев В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных.
М., Колос, 1976.
20. Соловьев В. Д., Бектемиров Г. А. Тканевые культуры в вирусологии.
М.: Медицина, 1963.
21. Уосли Дж. Новые методы культуры животных тканей. М.: Мир, 1976