

**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 ВАСХНИЛ, протокол № 2 от 14.V.86 г.

СОДЕРЖАНИЕ

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 переравар 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
1. 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
Использованная 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 элективные.

3. Среды для идентификации: дифференциальные и элективно-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 способные 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. Для

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 H_2 , NO_2^- , H_2S , 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).

Серу вносят 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 рибозах 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 железосеропротеиды. 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 $Zn, Mn, Na, Se, Mo, Fe, Co, Cu, W, Ni$. 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, пантотеновая 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 (Геттсхалк 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 – истощением 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 неопищенных 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 двухзамещенного 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 биосламентов, 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_2O , органические соединения, CO_2	
H	H_2 , H_2O , органические соединения	
N	NH_4^+ , NO_3^- , N_2 , органические соединения	
S	SO_4^{2-} , HS^- , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, органические соединения серы	Компонент цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, 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); Са-дипиколинат является важным компонентом эндоспор
Fe	Fe^{2+} , Fe^{3+}	Содержится в цитохромах, ферредоксинах и других железосеросопротеидах, 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 соли 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 комплексообразующих 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 комплексообразующих 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-полимеразах
Mn	Mn^{2-}	Содержится в бактериальной пероксидазмутазах; кофактор некоторых ферментов (фосфоенолпируват-карбоксикиназы, цитрат (2С)-синтазы).
Na	Na^{+}	Необходимы галофильным бактериям
Cl	Cl^{-}	
Mo	MoO_4^{2-}	Содержится в нитратредуктазе, нитрогеназе и форматдегидрогеназе
Se	Se^{2-}	Содержится в глицеринредуктазе и форматдегидрогеназе
Co	Co^{2+}	Содержится в коферменте витамин В ₁₂ -ферментов (глутаматмутаза, метил-малонат-CoA-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

среды. В неперебиваемых 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 прогрева 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 Михалыса, 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 осадка 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, а 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, имеющий 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 удастся 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, растворимый 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 мясотеппонный 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 протеолитический 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
Аминный 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 мороженые 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 удлиняется.

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 турбомагн при +45°C. Так как турбомагн 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 полотно. 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 мороженного), 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 нингидринная 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 аминного азота, наблюдается отрицательная биуретовая реакция и положительная реакция на триптофан.

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

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

Общий азот мг%	1025-1285
Остаточный азот мг%	900-1200
Аминный 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 на мясной воде.

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 сосиско-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 дойти 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 полотноый 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: 1. 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, желательно 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 аминокислот 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 основе.

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	1000,0 мл
(печеночный экстракт 1:1)	
Водопроводная или дистиллированная вода	2000,0 мл
(печеночный экстракт 1:2)	

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)
		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.)
		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 Кит-Тароцци	Водопроводная вода	375	1125	1875	3750			Разливается в пробирки с ку-сочками печени, сверху. наслаивает-ся вазели-новое мас-ло
		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	"-"	"-"	Осажда-ется белок (1 белок на 1 л.) фильтру-ется че-рез ватно 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 бе-лок на 1 л.) с 0,15% 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			
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 застива-ния сре-да осадок среза-ется.
	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 Раствор Рингера	На I яйцо раствора	10 мл			Не уста-нав-лив.	Стерилизовать в аппара-те для свертывания сыдоротки крови при 75°C по 1 часу 3 дни	
16.	Раствор Рингера	Хлористый кальций (CaCl_2) Хлористый калий (KCl) Дистилл. вода Хлористый натрий	0,25 0,42 1000 9,0	0,75 1,26 3000 27,0	1,25 3,0 5000 45	2,5 4,2 10000 90	Не уста-навлив.		
17.	Среда № 27	Гидролизат Хот-тингера (13мг% ам. аз.) Глюкоза Агар-агар	1000 10 15	3000 30 45	5000 50 75	10000 100 150	6,1-6,3	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	
18.	1,5% агар на гидролизате Хот-тингера (135мг% ам. аз.)	Гидролизат Хот-тингера (135мг% ам. аз.) Однозамещ. фосфат калия (KH_2PO_4)	1000	3000	5000	10000	5,7-5,9	" "	
19.	1,5% агар на гидролизате Хот-тингера (140мг% ам. аз.)	Гидролизат Хот-тингера (140мг% ам. аз.) Двузамещ. фосфат натрия (Na_2HPO_4)	1000	3000	5000	10000	7,8-8,0	" "	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20.	Среда № 28	Гидролизат Хоттингера (33мг%ам.аз.)	1000	3000	5000	100000	7,8- 8,0	Авто- клав. при 115°C 30 мин	
		Двузамещ. фосфат нат- рия (Na_2HPO_4)	3	9	15	30			
		Агар-агар	15	45	75	150			

21.	Тиогли- колие- вая среда	Гидролизат казеина	15	45	75	150	7,3	Авто- клав. при 121°C 20 мин.	Гидролизат и тиогликолие- вую кислоту добавляют после филь- трации.
		Дрожжевой экстракт 10%-ный	5	15	25	50			
		Агар-агар	0,752	2,25	3,75	7,5			
		Глюкоза	5	15	25	50			
		Цистин	0,752	2,25	3,75	7,5			
		Тиоглико- лиевая кислота	0,3	0,9	1,5	3			
		Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000			

3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МИКРООРГАНИЗМОВ

22.	Среда, Булира	Мясная вода	1000	3000	5000	10000	7,0	Авто- клав. при 115°C 30 мин.	В готовую сре- ду добавляют 0,1% р-р ней- тральрота. Раз- ливают в про- бирки с газов- ками.
		Пептон	12,5	37,5	72,5	125			
		Натрий хлорис- тый	5	15	25	50			
		Маннит	7,5	22,5	37,5	75			

23.	Среда Гисса- (сахара)	Пептон- ная во- да	100	200	300	400	7,7	Авто- клав. при 115°C 30 мин.	Сахар к объе- му-0,5%, реак- тив Андрее - 1 мл на 100 мл Разливается в пробирки по 5 мл.
		Сахар (требуе- мый)	0,5	1	1,5	2			
		Индика- тор Ан- дрее	1	2	3	4			

1	2	3	4	5	6	7	8 9	10
24.	Пептонная вода для сахароз (полу-видная)	Дистилл. вода Пептон 1% Натрий хлористый Агар	1000 10 5 3	3000 30 15 9	5000 50 25 15	10000 100 50 30	7,7	
25.	Среда Балчева	Дистилл. вода Мясная вода Пептон Цистин Натрий хлористый Фосфорно-кислый натрий однозамещ. NaH_2PO_4 Серно-кислый натрий Na_2SO_4 Железо лимонно-аммиачное зеленое $\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ Фенеловый красный Агар-агар	на 625 мл среды 500 125 7,5 0,1 1,5 1 0,5 0,5 0,0025 0,5	 375 22,5 0,3 4,5 3 1,5 1,5 0,0075 1,5	 625 37,5 0,5 7,5 5 2,5 2,5 0,0125 2,5	 1250 75 1 15 10 5 5 0,025 5	7,2	Авто-клав. при 115°C 30 мин. Разливается в пробирки по 5 мл
26.	Мясо-пептонный агар с 0,2% крахмала	Мясо-пептонный агар Крахмал	1000 2	3000 6	5000 10	10000 20	7,4	Авто-клав. при 115°C 30 мин. Крахмал добавляется после разведения в 25 мл воды.
27.	Мясо-пептонный бульон с 0,2% KNO_3	Мясо-пептонный бульон Калий азотно-кислый KNO_3	1000 2	3000 6	5000 10	10000 20	"	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
18.	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 стерилизующем паре по 15-20 мин.	Различается в стерильные 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Глюкоза Фенолрот 0,2%	1000	3000	5000	10000	7,3	Стерилиз. 3 дня по 20 мин. текущим паром	Разливается в стерильные пробирки
			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 углекислого натрия Na_2HCO_3	1000	до слабо-щелоч. реакции			7,1-7,2	"	Молоко желательное освободить от сливок
33.	Лакмусовое молоко	Молоко свежее 10% р-р углекислого натрия NaHCO_3 Лакмусовая настойка	1000	до слабо-щелоч. реакции				Не устойчив.	
			pH 7,1-7,2	50-100	/5-10%/				
34.	Мясопептонная желатина	Мясопептонный бульон Желатина	1000	3000	5000	10000	7,4	Автоклав. при 110°C 20 мин.	Осаждается (1 бел. на 1 л.) Разливается по 9-10мл.

III.

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

35.	Среда Кауфмана	Бычья желчь (стерильная) Среда Моллера Водный р-р бриллиантовой зелени /1:1000/	50	150	250	500	Не устойчив.	Стерильн. авток. 110°C 30 мин.	До стер. цвет среды зелено-серый, после - зелено-ватый-коричневый.
			1000	3000	5000	10000			
			10	30	50	100			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
36.	Среда Моллера	Мел химич. чистый CaCO_3 МЛБ (рН 7,6) <u>1. 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 Лп-голя: 1) кристалл. йод 2) водистый калий KI 3) дистил. вода	4,5 80-90 10 50 100 2 20 25 100	13,5 240-270 30 150 300 6 60 75 300	22,5 400-450 50 250 500 10 100 125 500	45 800-900 100 20 200 250 1000	Не устанав. накл.	Авто-клав при 115°C 30 мин. Грр стерилиз. в авток. Кола	Колбу с мелом стерил. сухим жаром, затем добавл. МЛБ Гипосульфит и р-р йода до бавляют перед употреблением
37.	Среда Киллиана	МЛБ (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 МЛБ
38.	Селени-товая среда	Пептон Натрий фосфорно-кислый двузамещ. Na_2HPO_4 Натрий фосф. кислый однозамещ. NaH_2PO_4 Лактоза Дистил. вода Натрий селенистый однозамещенный	5 7 3 4 1000 4	15 21 9 12 3000 12	25 35 15 20 5000 15	50 70 30 40 10000 30	Не устанав. накл.	Авто-клав при 115°C 30 мин.	Перед употребл. впробир. добавл. 0,2 мл селенисто-кисл. натр. 10% р-р

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
39.	Среда В.Л. Шига- нова и Г.П. Кали- на (для накопле- ния саб- монелл)	I. Пептон	8,4	25,2	42	84	Не уста- нав.	Авто- клав. при 115°C 30 мин.	После рас- творения ингреди- 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.-й калий одно- земещ. KH_2PO_4	2,85	8,55	142,5	285										
		Дистилл. вода	890	2670	4450	8900										
		2. Магний хлористый кристалл. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$								71,4	214,2	357	714			
		Дистилл. вода	900	2700	4500	9000										
		3. 0,5% водный р-р бриллианто- вой зелени								1,8	5,4	9	18			
		40.	Среда Минке (для культи- вирова- ния Е. коли с адгезив- ным анти- геном)	Готовятся следующие растворы:							7,5	Все р-ры казеи- но-стерми- новой от- к-ты можно исполь- зовать автоклав- при 115°C 30 мин. Р-ры 3 и 4 гидроли- зат в аппа- рате Коха.	Вместо казеино- вой дрож- жевой гидроли- зат (ВЦГ), или ги- дролизат лакталь- булина (ЛА)			
				I. Буферный раствор:												
Калий фос- фор.-кисл. однозамещ. KH_2PO_4	2,72															
Натрий фосф.-кисл. двузамещ. Na_2HPO_4	20,2															
Вода	до 1000															
Дистилл.	до 1000															
2. Р-р микроэлементов:																
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0															
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0															
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,135															
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4															
Вода	до 1000															
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	4,2	12,6	21	42	Не уста-навл.	Авто-"а" раст-клав.ворят при кипении 112°C затем 20 мин. прибавляют раство-ры "б" и "в".
	натрий хлористый	7,0	21	35	70		
	Калий фосф. кислый одно-замещ.						
	KH_2PO_4	1,5	4,5	7,5	15		
	Дрожжевой экстракт	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%-й 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 Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Агар-агар Аминопептид	500 250 250 10 5 2 50	1500 750 750 30 15 6 150	2500 1250 1250 50 25 10 250	5000 2500 2500 100 50 20 500	7,3	Авто-клав. при 115°C 30мин	
43.	Твердый агар по ВГНКИ (2,5% агара)	Водопроводная вода Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Агар-агар Аминопептид	500 250 250 10 5 25 50	1500 750 750 30 15 75 150	2500 1250 1250 50 25 125 250	5000 2500 2500 100 50 250 500	"-"	"-"	
44.	Полужидкий агар по ВГНКИ с 1% глицина	Водопроводная вода Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Глицин Агар-агар	500 250 250 10 5 10 2	1500 750 750 30 15 30 6	2500 1250 1250 50 25 50 10	5000 2500 2500 100 50 100 20	7,3	Авто-клав. при 115°C 30мин	
45.	Полужидкий агар по ВГНКИ с 3,5% натрия хлористого	Водопроводная вода Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Агар-агар	500 250 250 10 35 2	1500 750 750 30 105 6	2500 1250 1250 50 175 10	5000 2500 2500 100 350 20	"-"	"-"	

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
46.	Полужидкий агар пов. ГНКи с 0,02% цистеина	Водопроводная вода Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Цистеин Агар-агар	500 250 250 10 5 0,02 2	1500 750 750 30 15 0,06 6	2500 1250 1250 50 25 0,1 10	5000 2500 5000 100 50 0,2 20	7,3	Авто-клав. при 115°C 30 мин	
47.	Полужидкий агар пов. ГНКи с 10% желчи	Водопроводная вода Мясная вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый Желчь Агар-агар	500 250 250 10 5 100 2	1500 750 750 30 15 300 6	2500 1250 1250 50 25 500 10	5000 2500 2500 100 50 1000 20	" -	" -	
48.	Производственная жидкая питательная среда на основе ФКДГ (для получения биомассы кампилобактерий)	ФКДГ Амино-пептид-2 Сукцинат натрия Натрий хлористый Дистилл. вода	20-25 10 2,5-5 5 1000	60 30 7,5-15 15 3000	100 50 12,5-25 25 5000	200-250 100 25-50 50 10000	7,0-7,1	" -	
49.	Твердая сердечно-мозговая кровяная сафранино-новобиациновая среда для изоляции кампилобактерий и патматериала (среды МЭВ)	Сердечная вода Мозговой отвар Пептон Натрий хлористый Новобиоцин 0,2% р-р (10 мкг/мл) Сафранин Т. 0,5% водный р-р (25 мкг/мл) Цистеин Агар-агар	745 245 10 5 5 1 20	2235 735 30 15 15 3 60	3725 1225 50 25 25 5 100	7450 2450 100 50 50 10 200	7,0-7,2	Авто-клав. при 117°C 25 мин	Приготов-ление мо-егового отвара: в 1 кг фарша из свежих мозгов КРС до-бавля. 1 л водопр. воды, на-стаивают 16-24 ч. затем ки-пятят 1 ч, долив до первоначальн. объема

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

51. Мясо-пептонный печеночный-глицериновый бульон (МППТБ)

—"

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

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		Авто-клав при 115°C 30мин	В агар для флаконов, матриц 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	Перед употребл сыворотку КРС или лошади 10% и 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-сырко-вороточный 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°C 30 мин	Авто-клав. добав. сы- ротку КРС 10-20% или 10-15% ами- нопептида.	Перед упот- реблением

60.	Полужидкий печеночно-сырко-вороточный и печеночно-аминопептидный агар	Готовится так же, как плотная Агар-агара добавл. 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 Натрий 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	Авто-клав. 115°C 30 мин	
-----	---------------------	--	------------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------	--	-----	-------------------------	--

63.	Среды	Из расчета на 1 литр				Не уста- навли- вается	В аппара- те для свертыван. сыворо- ток при 85°C 40 мин. 2 дня.
	Цитрат - Лив	Молоко Крахмал Пептон Клубни картофеля Глицерин Малахитовая зелень 2% р-р водный Цельные яйца	300 12 2 2 шт 24 20 8 шт	600 24 4 4 шт 48 40 16 шт			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
64. Среда Френсиса	Мясная вода Пептон Натрий хлористый Глицерин	1000 40 5 100	3000 120 15 300	5000 200 25 500	10000 400 50 1000		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 пробирку РУ наливается 4% глицириновая вода (рН=7,0) и кладется картофель, вырезанный 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 однозамещенный (KH_2PO_4) Яичная масса	600 0,24 0,6 3,6 12 30 20 2,4 1000	1800 0,72 1,8 10,8 36 90 60 7,2 3000	3000 1,2 3,0 18 60 150 100 12 5000	6000 2,4 6,0 36 120 300 200 24 10000	В аппарате свертыв. сыворо-ток при 85°C 40 мин 2 дня		Смесь перемешивается со стеклянными бусами	
68. Полужидкая среда на основе полу-синтет. среды Школей-Никовой (для культивирования микробактерий)	Калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 Натрий фосфорнокислый двузамещенный Na_2HPO_4 Сернокислый магниевый $(MgSO_4)$	1,5 2,5 0,5	4,5 7,5 1,5	7,5 12,5 2,5	15 25 5		Не уста-нав. 120°C 30мин	Авто-клав. 120°C 30мин	За 3 дня перед употреблением на 700 мл среды-100мл 20% сахарозы и 100мл сы-вки КРС

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

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- навл.	Авто- клав при 120°C 20мин	
	II Солевой р-р:								
	Магний серно- кислый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5							
	Натрия цитрат $Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	1							
	Квасцы же- лезоамми- ачные $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,05							
	Калий фосф. кислый одно- замещ. K_2HPO_4	20							
	Аммоний цитрат одно- замещ. $NH_4C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	5							
	Натрий глюта- миновокислый 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 $C_6H_8C_7 \cdot H_2O$	4	12	20	40				
	Калий фосф. кисл. двузамещ. K_2HPO_4	5	15	25	50				
	Магний серно- кислый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	1,5	2,5	5				
	Железо серно- кислосое $Fe_2(SO_4)_3$	0,05	0,15	0,25	0,5				
	Аммоний цит- рат двузамещ. $(NH_4)_2C_6H_5O_7$	2	6	10	20				

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Цинк серно-кислый 1gSO_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 каплям
		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	Авто-клав при 115°C 30мин	Фильтрруется через бумажный фильтр	
		Мясная вода	500	1500	2500	5000	8,2		
		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 Эдварса		Водопроводн. вода	500	1500	2500	5000	8,4	Авто-клав при 115°C 30мин	Осаждается (16 часов 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 фермента- тивного млечного гидро- лизата на р-ре Хенк- са для культиви- рования микоплазм из куль- тур кле- ток (поку- шидная)	ФГМ-С Дистилл. вода Р-р Хенкса: KCl CaCl ₂ · 2H ₂ O MgSO ₄ · 7H ₂ O NaHCO ₃ MgCl ₂ · 6H ₂ O Na ₂ HPO ₄ · 4H ₂ O Глюкоза Агар "Дифко"	20 1000 8,0 0,4 0,185 0,2 0,35 0,1 0,06 1,0 3	60 3000 24 1,2 0,56 0,6 1,05 0,3 0,18 3,0 9	100 5000 40 2 0,97 1,0 1,75 0,5 0,3 5,0 15	200 10000 80 4 1,85 2,0 3,5 1,0 0,6 10,0 30	8,0-8,2	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Перед упот-реблением добавляют дрожжевой экстракт (10%) и сыворотку КРС или лошади (10-20%).
80.	0,3% агар из перева-ра бычьего сердца	Бульон из пе-рерава бычье-го сердца Агар-агар	1000 3	3000 9	5000 15	10000 30	7,8	Автоклав. при 110°C 30 мин.	
81.	2% агар из пере-вара бычьего сердца	Бульон из пе-рерава бычье-го сердца Агар-агар	1000 20	3000 60	5000 100	10000 200	"-"	"-"	Можно прос-ветлить бел-ком куриного яйца-1 белок на 1 л среды
82.	Среда Хейфли-ка	Агар "Дифко" 1,5-2% Сыв-ка крови лошади инак-тивированная Дрожжевой экстракт 250 р-р	700 200 100	2100 600 300	3500 1000 500	7000 2000 1000	8,0	Авто-клав. при 115°C 30 мин.	Сыворотку добавляют после сте-рилизации
83.	Среда ВЛЗВ	Пептон Мартена Мясная вода	500 500	1500 1500	2500 2500	5000 5000	8,0	Авто-клав. при 120°C 30 мин.	Перед упот-реблением добавляют 20% стерил. сыв-ки и 10% дрожж. экстракта.
84.	Плотная среда ВЛЗВ	Пептон Мартена Мясная вода Агар-агар	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. и И. Погани	Дистилл. вода Натрий хлористый Натрий фос- форно-кисл. двузамещ. Na_2HPO_4 Фенол-рот Пептон Дрожжевой экстракт Сыв-ка кро- ви лошади	1000 2,5 2,5 0,024 0,075 200 200	3000 7,5 7,5 0,072 0,225 600 600	5000 12,5 12,5 0,12 0,375 1000 1000	10000 25 25 0,24 0,75 2000 2000	8,0- 8,2 при 120°C 30 мин	Авто- клав, употребл. при 120°C 30 мин	Перед добавлен 20% стер- сыв-ки и 10% дрож- экстракта
86.	Среда Л. Штип- кович	Дистилл. вода Бакто-агар с триптозой Мальтоза Натрий хлористый Натрий фосф. кисл. двузам. Na_2HPO_4 Фенол-рот Дрожжевой экстракт	1000 20 25 5 2,5 0,024 10	3000 60 75 15 7,5 0,072 30	5000 100 125 25 12,5 0,12 50	10000 200 250 60 25 0,24 100	6,7- 7,8	Авто- клав, при 115°C 30 мин	— — —
87.	Среда Р.Р. Чал- квиста	Бульон "Дифко" (DMLO) Глюкоза Дифосфопи- ридинукле- отид Цистеин гидрохлор- ид Фенол-рот Дистилл. вода	22,5 10 0,02 20 50 1000	67,5 30 0,06 60 150 3000	112,5 50 0,1 100 250 5000	225 100 0,2 200 500 10000	8,0	— — —	— — —

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 устанав.		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_2HPO_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-
	Агар-агар	25	75	125	250	Автоклав при 115°C 30 мин.			ется. Фильтруется через ватно-марл. фильтр
90. Сусло-агар	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	7,8		Авто-клав при 110°C 30 мин.	При разли-ве в мат-расы (спелзает) добавляет-ся 2% сахара
	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 казеиново-дрожжевым гидролизатом (ЖИДГ)	Водопр. вода Сусло Агар-агар ЖИДГ	500 500 25 5	1500 1500 75 15	2500 2500 125 25	5000 5000 250 50	7,8 7,8 7,8 7,8	Авто-клав: 110°C 30мин	При разливе в матрасы (используются) агара добавляется 3%
94.	Среда Сабуро	Водопр. вода Пептон Мальтоза (глюкоза) Агар-агар	1000 10 40 18	3000 30 120 54	5000 50 200 90	10000 100 400 180	6,2	Авто-клав: 115°C 30мин	
95	Картофельный агар	Водопр. вода Очищенный картофель Агар-агар	1000 200 20	3000 600 60	5000 1000 100	10000 2000 200	Не устанавливал.	Авто-клав: 115°C 30мин	
96.	Среда Ван-Инт-терсона	Водопр. вода Аммоний азотно-кислый NH_4NO_3 Калий фосф. кислый однозамещ. KH_2PO_4	1000 0,5 0,5	3000 1,5 1,5	5000 2,5 2,5	10000 5,0 5,0	-	-	
9. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ.									
97.	Среда Петровского (для культивирования трихомонад)	Водопр. вода Печеночная вода Пептон Натрий хлористый мальтоза	750 250 10 5 10	2250 750 30 15 30	3750 1250 50 25 50	7500 2500 100 50 100	7,7 7,7 7,7 7,7 7,7	Авто-клав: 115°C 30мин	Разливается в пробирки по 9 мл под вакуумом.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
98.	Среда Сум- цова-Ман- жос для культиви- рования балансидий	Дистилл. вода Натрий хлористый Натрий фосф. кислый двузамещ. Na_2HPO_4 Калий фосф.-кислый однозамещ. KH_2PO_4	1000 3000 5000 10000	7 21 35 70			Не уста- навля.		
			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 разли-вается 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 лизата слизистой оболочки тодстого отдела кишечника свиней или по 1 мл флор.

99.	Питатель- ная среда для изоля- ции и куль- тивирования трепонем	Гидроли- зат Хот- тингера (130-140 мг% ам. аз)	2/3 объема сосуда	7,0- 7,2 Уста- навля. во время барбо- тиро- вания	Гидролизат готовится из муки сои, го- роха или слизистой оболочки тон- кого отдела кишечника. Из 3-4 кг поджелудоч- ной железы готовят фарш перемолотой его дважды на мясорубке Бобы сои и гороха разма- ывают, зали- вают дистилл водой 1:3 муку и кипя- тят 20 мин при посто- янном поме- шивании. После ос- тавления до 40°C 10%- NaOH уста- навливают рН 7,8-8,0 и вносят в количестве 10% подже-
		Добавляют по весу: Резазурин (индикатор редукции кислорода) 0,001% Натрий хлористый 0,5% Глюкоза 0,25% Пентон 1% Бактоагар 2% "Ди'к"			
		0 редуции кислорода в среде судят по из- менению цвета резазурина - от голубого к бесцветному через розовый. К концу кипя- чения среда должна приобрести естественный цвет (цвет до прибавления резазурина). За- тем среду моментально закупоривают стериль- ной резиной пробкой, выносят в бокс и про- пускают через нее обескислороженный угле- кислый газ или азот в течение 15 мин. К концу барботирования в среду вносят 0,05% цистенна - гидрхлорида, сосуд моментально закупоривают пробкой и охлаждают в ледяной бане.			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		<p>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/мл спектиномицина, разливают в боксе по пробиркам в атмосфере обескислороженного CO_2 или N_2 и закрывают ватно-марлевыми пробками.</p>							<p>лудочной 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 гидролизе 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 пре- крашения нараста- ния амин- ного азо- та (300- 400 мг%) бутыли с перева- ром хра- нят при комнат- ной тем- пературе.</p>

1	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 (1:50 мл % 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 9 мл в 30мин
	Мясная вода	375	1125	1875	3750		Разливается по пробирки с кусочками мозга овец, сверху наливается вазелиновое масло.
	Печеночная вода	250	750	1250	2500		
	Пептон	10	30	50	100		
	Натрий хлористый	5	15	25	50		
	Агар-агар	1	3	5	10		
См. также среда Китт-Тарончи, рец. № 6 стр. 27							

11. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

102. Среда для культивирования коринебактерий (ВиЭВ)	ФКДГ	20	60	100	200	7,6-7,7	Автоклав. при 120°C 30мин
	Твин-80	0,006	0,018	0,03	0,06		
	Натрий цитрат	0,05	0,15	0,25	0,5		
	$\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$						
	Натрий сукцинат						
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4$	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		
	Mn_2Cl	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 корине-бактерий (ВИБВ)	$2\text{H}_2\text{SO}_4$.7H ₂ O FeSO_4 7H ₂ O CaCl_2 .4H ₂ O Na_2MoO_4 .2H ₂ O CuSO_4 .2H ₂ O ЗДТА Вода дистилл.	0,006 0,015 0,015 0,015 0,075 0,045 0,005	0,018 0,045 0,045 0,075 0,225 0,135 0,015	0,03 0,075 0,075 0,075 0,375 0,225 0,025	0,06 0,15 0,15 0,15 0,75 0,45 0,05	Не устанав.		
			1000	3000	5000	10000			

12. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЕМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.

102. Среда для культивирования <i>H. pylori</i> - <i>monilae</i>	6-н Хот-тингера (200мг% ам. аз.) ДПН (дифосфогирминуклеотид) 10мкг/мл Глюкоза $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 мкг/мл	1000	3000	5000	10000	Не устанав.	Вместо ДПН 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 (Телищевская Л.П. и др. 1983)

Для оценки эффективности питательных сред ВГНМ предлагает определение концентрации микробной взвеси через 24 ч инкубации по показателю оптической плотности (Е) на 430 нм 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	- 0,12
<i>Mycella</i> <i>flexuosa</i> 8516	- 0,12
<i>Corynebacterium diphteriae</i> 1911	- 0,12

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

ВВЕДЕНИЕ

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 электропроводимости, выраженной в микросименсах - μS или единицах удельного сопротивления, выражаемого в мегамах (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 Мом, т.е. высшей технически достижимой степени чистоты.

Таблицы пересчета: электропроводимость - удельное сопротивление прилагается.

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

Питательные среды на основе гидролизата лактальбумина (ГЛА), 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 $KS-I$ и стерилизуют через пластины $C\Phi$, $KS-2$ 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 37°C 1 сутки, затем хранят при температуре 4°C в течение месяца или в замороженном состоянии в течение нескольких месяцев.

ТАБЛИЦА ПЕРЕСЧЕТА ПРОВОДИМОСТЬ - СОПРОТИВЛЕНИЕ.

μS (микросиммменс)	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

ж

I Солевые растворы

№ пп	Назва- ние р-ра	Назва- ние ин- гредиента	К-во ингредиентов (в г) на объем (в л)			рН до стери- лизации	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. 30 мин без CaCl ₂ и глюкозы. Или че- рез пла- стины СФ, КС-2, или мил- липор. фильтр 0,22 мкм	
		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			
		Ka 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			
2.	Раствор Хенкса для про- мывания тканей	NaCl	8,0	40	80	7,0-7,1	Автоклав. при 0,5 атм 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			
		Ka 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 и глюкозы или через пластины СФ, КС-2 или милли- пор. фильтр 0,22 мкм	
		KCl	0,4	2	4			
		CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	1	2			
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,5	1			
		KaH 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			
4.	Раствор тироде	NaCl	8	40	80	7,2-7,3	Автокла- виров. при 0,5 атм 30 мин или СФ, КС-2 или мил- липор. фильтры 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			
		KaH 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			

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5.	0,02% р-р Версена (трилонВ)	NaCl KCl $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 (водораст-воримый)	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 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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.	0,02% р-р трип-сина "дифко" на фосфатном буферном р-ре (2БР)	NaCl KCl $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 Фенол-рот 0,02% Трипсин ("дифко") Пенициллин Стрептомицин	8 0,2 0,1 1,42 0,2 2мл 2,5 100 тыс. ед.	40 1 0,5 7,1 1 10 мл 12,5 500 тыс. ед.	80 2 1 14,2 2 20 мл 25,0 1 млн. ед.	6,8	Предварительная фильтрация через пластыни БКС-1. Стерилизация через пласт. СЗ, БКС-2, мидиопорные 0,22 мкм	Перед работой довести рН р-ра до 7,4-7,6 двууглекислой содой

1	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl KCl $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ KH_2PO_4 Глюкоза (медицин.) Фенол-рот 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 10мл 12,5 25	80 4 0,6 0,6 10 20мл 25 50	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕКБ-1 Стерилизация через пластины СБ, ЕКБ-2, или милли-поровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,4-7,6 двукратно углекислой содой
			Пенициллин 100тыс.ед. 500тыс.ед. 1млн.ед.					
			Стептомицин 100мг 500мг 1000 мг (1 г.)					

2. Питательные среды.

1.	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 10мл 25	80 7-7,1 4 1,4 1 0,6 0,6 6 10 20мл 50	Предвар. фильтр. через пластины ЕКБ-1. Стерили- зация через пластины СБ, ЕКБ-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 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 Пенициллин Стептомицин	6,8 0,4 0,2 0,1 0,125 1,2 1 2мл 5 100тыс. 100мг	34 2 1 0,5 0,625 6 5 10мл 25 500тыс. 500мг	68 7-7,1 4 2 1 1,25 12 10 20мл 50 1000 мг (1,0г)	Предвари- тельн. филь- трация чер- ез пластин- ы ЕКБ-1 Стерилиза- ция через пластины СБ, ЕКБ-2, или милли- поровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести рН до 7,2-7,3 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 (МГМ-С)	NaCl KCl $\text{CaCl}_2 (6\%)$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 100 тыс. ед.	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,75 5 10мл 15г 500 тыс. ед.	80 4 1,4 1 1 0,6 0,6 1,5 10 20мл 30г 1000 мг (1 г)	6,7-6,8	Предварительная фильт. через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины ЕКС-2 или миллипоров. фильтр 0,22мкм	Перед работой довести рН р-ра до 7,2-7,3 двух-лестной содой

№. пп	Название 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 химических реактивов, НПО "Биолар", 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 1 л. 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 бутыли до 10 л.	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕКС-1 Стерилизация через пластины СЖ, ЕКС-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	

I	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl KCl $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 Глюкоза (медицин) Фенол-рот 0,5% Трипсин "Дитко" 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 10мл 12,5 25	80 4 0,6 0,6 10 20мл 25 50	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины СТ, ЕКС-2, или милли-поровый 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,г)

2. Питательные среды.

I.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Хенкса	NaCl KCl CaCl ₂ (безводн.) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 NaHCO_3 Глюкоза Фенол-рот 0,5% 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. филтр. через пластины ЕКС-1. Стерилизация через пластины СТ, ЕКС-2 или милли поровый фильтр 0,22мкм.	Перед работой довести pH р-ра до 7,2-7,3 р-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) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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	Предварительн. филтрация через пластины ЕКС-1 Стерилизация через пластины СТ, ЕКС-2 или милли-поровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,2-7,3 7,5% 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 (в 1 л)	NaCl KCl CaCl_2 (6/л) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 100 тыс. ед. 100 мг	40 2 0,7 0,5 0,5 0,3 0,75 5 10 мл 15 г 500 тыс. ед. 500 мг	80 4 1,4 1 1 0,6 0,6 1,5 10 20 мл 30 г 1000 мг (1 г)	6,7-6,8	Предварительная фильт. через пластины ЕК5-1 Стерилизация через пластины ЕК5-2 или мил-дипоров. фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести рН р-ра до 7,2-7,3 двух-лестной со-дой

№	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 химических реактивов, НПО "Биодар", Латв. ССР	<p>Одна упаковка сухой среды Игла состоит из 2-х флаконов, рассчитанных для приготовления 10 л. питательной среды. Для приготовления среды Игла необходимо:</p> <p>1. Растворить содержимое флакона № 1 (смесь аминокислот, витаминов, глюкозы, фенолового красного и неорганических солей), в 1 л деминерализованной воды.</p> <p>2. Растворить флакон № 2 (натрий двууглекислый в 1 л. бидистиллированной воды.)</p> <p>3. Предварительно профильтровать содержимое флакона № 1 через фильтр ЕК5-1 и довести объем деминерализованной водой до 8 л., прилить раствор флакона № 2 и довести содержимое бутылки до 10 л.</p>	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕК5-1 Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или милли-поровый фильтр 0,22 мкм	

№ пп	Название питательн. среды	Название ингредиентов	К-во ингредиентов (в г) на объем во- ды (в л)			pH до стерм- лизац.	Режим стерили- зации
			1л	5л	10л		
5.	Среда Игла MEM	NaCl	6,8	34	68	7,3-7,4	Предвари- тельная фильтрация через ЕК5-1 Стерилиза- ция через пластины СЭ, ЕК5-2 и или милли- 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		
		MnH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15	0,75	1,5		
		MnHCO 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		
		Инсулит	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 казеино-дрожжевой гидролизат (ФКДГ) на р-ре Хенкса	NaCl KCl CaCl ₂ ·6H ₂ O 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 (1г)			

Солевой р-р (1 л) и навеску ФКДГ, разведенную в 1 л деминерализованной воды предварительно отдельно фильтруют через ЕК\$ -1, затем их смешивают, доводят до 10 л деминерализованной водой и стерилизуют через пластины СФ, ЕК\$ -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-							
биопрепар-	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 B ₆	0,001	0,005	0,01				
	Витамин B 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 культиви- рования клеток среды (конди- ционированные) сливают в бу- тыли емк. 3-5 л. и хранят в хо- лодильнике при 4°C и добавляют к ним следующие ингредиенты: (срок хранения - 2-е недели)	рН до стери- лизации	Режим стери- лизации	Приме- чание		
8.	Кондициони- рованные среды: Игла ГЛА и среда 199	Использованные после культиви- рования клеток среды (конди- ционированные) сливают в бу- тыли емк. 3-5 л. и хранят в хо- лодильнике при 4°C и добавляют к ним следующие ингредиенты: 1. Глюкоза - 1 г/л 2. Витамин В ₆ - (тиаминабромид) - 0,001 г/л 3. Глютамин - 0,3 г/л 4. NaHCO ₃ - (7,5%) до рН среды 7,2-7,3	6,5-6,7	Приготов- ленные среды стерили- зуют че- рез пла- стины СФ, ЕКС-2 или мил- липоров. фильтр 0,22мкм				
9.	Питатель- ная среда 199, сухая "Дифко"	Один флакон сухой среды 199, содер- жащий 110г порошка растворяют в 3 л воды при постоянном поме- шивании. Доводят раствор до 37°C до полного растворения по- рошка и доливают деминерализо- ванной воды до 10л, затем рН раствора доводят до 7,2-7,4, добавляя 35 мл 10% раствора би- карбоната или 3,5 г сухого бикар- боната натрия.	7,7-7,4	Стерилизация через пласти- ны СФ, ЕКС-2, или миллипоро- вый 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 заворачивают 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 паропроводный 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 прогревания 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. Джаец Э., Мельник Дж.Л., Эйдельберг 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. - Водетень ВИАВ, вып.49. - М.:ВИАВ, 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, ВГНКИ 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. Баснакьян 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