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

Москва — 1986

gost.e-ecolog.ru

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 Ю.И.Костина, аспирант О.Ш.Расулев, ст.н.сотр.
Всесоюзного научно-исследовательского и технологического
института биологической промышленности Госагропрома СССР
(ВНИТИБП) 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 I4.У.86 г.

СОДЕРЖАНИЕ стр.

I. I. 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 I2
7. Техника изготовления питательных сред I5
II. Приготовление полуфабрикатов питательных сред I6
I. Мясная вода I6
2. Пептон Мартена I8
3. Мясной перевар по Хоттингеру 20
4. Печеночный экстракт 23
5. Сердечный экстракт 24
6. Дрожжевой экстракт 24
7. Определение триптофана 24
III. Основные и специальные бактериологические питательные среды - расчеты и методы их приготовления 26
I. Основные питательные среды 26
2. Питательные среды для изучения метаболизма микроорганизмов 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 4I
7. Питательные среды для культивирования микоплазм 46
8. Питательные среды для культивирования грибов 49
9. Питательные среды для культивирования простейших 50
I0. Питательные среды для культивирования анаэробов 53
II. Питательная среда для культивирования коринебактерий . . 53
I2. Питательная среда для культивирования гемофильных бактерий 54
IУ. Биологический контроль питательных сред 54
У. Определение показателей эффективности 54
УI. Растворы и питательные среды для культивирования клеток и вирусов 55
ВВедение 56
Таблица пересчета проводимость-сопротивление 57
I. Солевые растворы 58
2. Питательные среды 60
УII. 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 (накопительные).

Питательные среды применяют для выращивания микробов, выделения их в чистой культуре, изучения ряда свойств микробов и длительного сохранения свежевыделенных и производственных культур (Биргер 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 (Готтшалк 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. Дл

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

Разделение микроорганизмов на группы по типам питания

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

I. 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_3N, NO_2^-, H_2, восстановленные формы серы /H_2S, S, S_2O_3/ или закисное железо. В эту группу входят только представители бактерий.

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

I) 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 I00 мкг/мл (Перт С.Дж., I978).

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./, I982).

Сера вносится в среду в форме одного из неорганических веществ, в частности, сульфата или в виде цистеина или метионина. При аэробных условиях цистеин почти нацело превращается в цистин (Перт С.Дж., I982).

Фосфор обычно вносят в среду в виде неорганических фосфатов. Кроме того, можно использовать органические фосфаты, такие, как глицерофосфат и фосфолипиды (Перт С.Дж., I982).

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 I 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 менятся 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., I982).

Магний является кофактором многих ферментов (например, киназ); присутствует в клеточных стенках, мембранах и эфирах фосфорной кислоты. Экономический коэффициент в расчете на ионы потребленного магния варьирует от 300 до 900 г сухой биомассы в расчете на I 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 Ю.С., 1981). Биологическое значение хлорида натрия состоит в том, что он создает условия изотонии, необходимые для нормального течения всех жизненных процессов в микробной клетке (Синюшина Л.Н., Самсонова М.Н., 1981).

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

I) Витамины и родственные соединения, требующиеся в малых количествах;

2) Аминокислоты;

3) Пурины и пиримидины.

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

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

4. Подбор состава бактериологических питательных сред

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

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

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

5. Определение потребностей питания

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Если культура интенсивоно 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 добавлять углекислый (нерастворимый карбонат) нельзя. Еще большие затруднения встре-

Таблица I

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

Элемент	Источник	Функция в метаболизме
C	Органические соединения, CO_2	Основные компоненты клеточного материала клетки
O	O_2, H_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, $S_2O_3^{2-}$, органические соединения серы	Компонент цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, кофермента А, биотина и α-липоевой кислоты
P	HPO^{2-}	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов 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 железосеропротеидах, кофактор ферментов (некоторые дегидротазы

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 слабокислых, который 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°С растворенный в воде тиамин окисляется в течение недели приблизительно на 50% и теряет биологическую активность. Он распадается при автоклавировании в течение 5 мин. при I2I°С. Рибофлавин разрушается в процессе автоклавирования при I2I°С в течение I ч. при pH=7,0, но при кислых значениях pH он более устойчив. Рибофлавин светочувствителен и под действием комнатного рассеяного света при 32°С может разрушиться за I ч. на 50%, однако имеются данные и о менее интенсивном разложении рибофлавина - на I3% за I57 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	Источник	Функция в обмене веществ
Zn	Zn^{2-}	Содержится в алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК- полимеразе
Mn	Mn^{2-}	Содержится в бактериальной пероксидаземутазе; кофактор некоторых ферментов (фосфоенолпируват-карбоксикиназы, цитрат (*re*(-синтазы).
Na Ce	Na^{+} Ce^{-}	Необходимы галофильным бактериям
Mo	MoO_4^{2-}	Содержится в нитратредуктазе, нитрогеназе и формиатдегидрогеназе
Se	SeO_3^{2-}	Содержится в глицеринредуктазе и формиатдегидрогеназе
Co	Co^{2+}	Содержится в коферменте витамин B_{12}-ферментов (глутаматмутазе, метилмалонил-СоА-мутазе)
Cu	Cu^{2-}	Содержится в цитохромоксидазе
W	WO_4^{2-}	Содержится в некоторых формиатдегидрогеназах
Ni	Ni	Содержится в уреазе; требуется для автотрофного роста водородных бактерий

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

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

7. Техника изготовления питательных сред

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

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

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

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

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

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

5. Осветление питательных сред. Для обеспечения прозрачности питательных сред в некоторых случаях рекомендуется предварительная стерилизация гидролизатов при различных зонах pH с последующей фильтрацией выпадающих осадков. Однако к этому приему лучше прибегать в тех случаях, когда не удается добиться прозрачности сред при изготовлении их из хорошо отстоявшихся (не подвергшихся стерилизации) гидролизатов, экстрактов и т.д., а также осветления можно добиться с помощью яичного белка или кровяной сыворотки. Для этого на каждые I-2 л среды, остуженной до 50°С, 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 I0-I5 мин.(Биргер М.О.).

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

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

6. Фильтрование 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, бутыли.

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 высших 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: (мясная вода I:I)	мясной фарш	I,0 кг
	дистиллированная или холодная водопроводная вода	I,0 л
Пропись: (мясная вода I:2)	мясной фарш	0,5 кг
	дистиллированная или холодная водопроводная вода	I,0 л
Пропись: (мясная вода I:4)	мясной фарш	0,25 кг
	дистиллированная или холодная водопроводная вода	I,0 л

Во всех случаях на выкипание добавляется I0% воды.

Мясную воду можно готовить двумя способами:

I-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 I:I. 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 I8-24 часов при +4°С. Варить как описано выше.

Отстоявшуюся прозрачную часть мясной воды темно-золотого цвета (I:I) или соломенно-желтого (I:2 или I: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 натра, что удобно при последующем приготовлении сред.

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

Стерилизуют при I2I°С (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 I%, если pH иной, то его доводят соляной кислотой.

Соляная кислота добавляется в количестве 0,7 мл (уд.в.I,I9) на I00 мл мясной воды. pH мясной воды после добавления кислоты I,9. Процент образующейся соли после нейтрализации - 0,5%, и мясопептонный бульон полностью обеспечивается необходимым количеством хлорида натрия

Уксусная кислота добавляется в количестве I,4 мл на I00 мл мясной воды (уд.в.I,0055), что дает pH=3,7I с содержанием хлористого натра после нейтрализации 2,0%.

Биохимический состав мясной воды

Общий азот мг%	I98-360
Остаточный азот мг%	I45-330
Аминный азот мг%	45-98
Сухой остаток %	I,56-3,06
Полипептиды %	I,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 (I,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 I,5-2,5 при 40°С. 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 (парные) 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 натощак.

Переваривание можно считать законченным, когда фарш станет гомогенным, 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%	I30-I50
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°С	I,0 л
	соляная кислота уд.в.I,I9	I9,0 мл

I. 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:

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

При ручном способе переваривание длится I8-32 часа. Если же переваривание проводится при +37°С, то оно еще больше удлиняется.

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

2-й способ (механический). Фарш закладывают в полиэтиленовые баки емкостью 40 л, заливают подкисленной и подогретой до +48-50°С водой, ставят на турбомагн при +45°С. Так как турбомагны меньше по диаметру, чем баки и их нужно отцентрировать по отношению к магни ту, то баки нужно оставлять на подставках высотой

(около 0,5 см). Для перемешивания 30,0 л пептона Мартена достаточно иметь магнит длиной 6,5 см; на 10,0 л - 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°С 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 бутыли по 3/4 емкости. Стерилизуют при 110-112°С 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.,1983)

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

Приготовление триптического перевара неполного расщепления

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

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

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

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

2. После экстрагирования (утром) добавить столько же воды, т.е. 100 мл. Таким образом, получается экстракт I:2 Подогреть до +50°С (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°С под резиновой пробкой, использовать ее можно через 2-3 дня после приготов-

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°С и pH 8,0-8,1 закладывается первая часть панкреатина или фарша поджелудочной железы. Отмечается 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 аминного 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°С, т.к. инактивируется фермент, и не ниже +40°С, т.к. будет брожение.

Весь процесс переваривания длится около 4-х часов и количество аминного 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 полотняный фильтр и расфасовывается.

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

Приготовление триптического перевара полного расщепления

Пропись:	Сырой говяжий фарш	100,0 г
	Водопроводная или дистиллированная вода +45°С	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 бутылям, добавляют воду, тщательно перемешивают.

2. Смесь подщелачивают 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. Бутыли закрывают резиновыми пробками, хорошо перемешивают.

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

6. Ставят для переваривания при +45°С.

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 отстаивается 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°С, а потом его можно употреблять для приготовления сред. За это время происходит медленное нарастание аминного азота и оседание осадка, благодаря чему его можно декантировать, объем надосадочной жидкости будет больше.

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

4. Печеночный экстракт

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

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

Пропись:

Печень кусками 50,0-70,0	1000,0 г
Водопроводная или дистиллированная вода	1000,0 мл
(печеночный экстракт I:I)	
Водопроводная или дистиллированная вода	2000,0 мл
(печеночный экстракт I: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°С 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 I 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°С 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.Пешкова

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

Реактивы:

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

- ледяная уксусная кислота.

Ход определения

В пробирку вносят I мл испытуемого раствора (питательной среды или 2%-ного раствора гидролизата), добавляют 4 мл дистиллированной воды, I мл ледяной уксусной кислоты и титруют из бюретки I%-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 аминного 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.

Ш. ОСНОВНЫЕ И СПЕЦИАЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

I. ОСНОВНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

№№ пп	Название среды	Наименование ингредиента	К-во ингредиентов (г,мл) на объем среды (мл) 1000	3000	5000	10000	pH до стерилиз.	Режим стер.	Примечание
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I.	Пептонная вода	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	7,6-7,7	Автоклав. при 115°С 30 мин.	Фильтруется через бумажный фильтр
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
2.	Мясопептонный бульон	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000			Фильтруется через бумажный фильтр
		Мясная вода	500	1500	2500	5000	7,7	- "-	
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Пептон	10	30	50	100			
3,	Мясопептонный агар	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000			Осаждается яичным белком (1 белок на 1 л) Фильтруется через ватно-марлевый фильтр
		Мясная вода	500	1500	2500	5000	-"-	-"-	
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	25	75	125	250			
4.	Мясопеченочный агар	Водопр. вода	500	1500	2500	5000	7,3-7,4	Автоклав. при 115°С 30 мин.	Осаждается яичным белком (1б.на 1л.) Фильтруется через вай-марлевый фильтр. Глюкозу добавл перед фильтр.
		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			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
5.	Мясопеченочный бульон	Готовится также как и агар, но без добавления агара	-"-	-"-	-"-	-"-	-"-	-"-	
6.	Среда Китт-Тароцци	Водопроводная вода	375	II25	I875	3750			Разливается в пробирки с кусочками печени, сверху наслаивается вазелиновое масло
		Мясная вода	375	II25	I875	3750			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500	8,4	-"-	
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	3	I5	25	50			
7.	Бульон на перевареХоттингера(33 мг% ам.аз.)	Перевар Хоттингера(33 мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I0000	6,I-6,3	-"-	
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
8.	Бульон на перевареХоттингера(I00мг% ам.аз.)	Перевар Хоттингера(I00мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I0000	7,8-8,0	-"-	
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
9.	Бульон на перевареХоттингера(200мг% ам.аз.)	Перевар Хоттингера(200мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I0000	7,6-7,8	-"-	
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
I0.	Бульон на перевареХоттингера(300мг% ам.аз.)	Перевар Хоттингера(300мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I0000	7,4-7,6	-"-	
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
II.	Дрожжевой мясопептонный бульон	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	7,4-7,6	Автоклав. при II5°С 30 мин.	Фильтруется через бумажный фильтр
		Дрожжевой экстракт	I00	300	500	I000			
		Мясная вода	400	I200	2000	4000			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
I2.	Дрожжевой агар	Водопроводная вода	900	2700	4500	9000	-"-	-"-	Осаждается белком (I белок на I л.) фильтруется через ватно марлевый фильтр.
		Дрожжевой экстракт	I00	300	500	I000			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Агар-агар	25	75	I25	250			
I3.	Агар по ВГНКИ (с 0,I5% агара)	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	7,3	Автоклав. при II5°С 30 мин.	Среда с 2% агара осаждается (I белок на л) С 0,I5% агара фильтруется через бумажный фильтр
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	I,5	4,5	7,5	I5			
I4.	Картофельный агар (по Карнеевой)	Водопроводная вода	I000	3000	5000	I0000	7,0	Автоклав. при II5°С 30 мин.	Ингредиенты добавл. в картофельный бульон. После застывания среды осадок срезается.
		Очищенный картофель	500	I500	2500	5000			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Глицерин	30	90	I50	300			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
I5.	Среда Дорсэ	Яичная масса Раствор Рингера	На I яйцо раствора		I0 мл		Не устанавлив.		Стерилизовать в аппарате для свертывания сыворотки крови при 75°С по I часу 3 дня
I6.	Раствор Рингера	Хлористый кальций ($CaCl_2$) Хлористый калий (KCl) Дистилл. вода Хлористый натрий	0,25 0,42 I000 9,0	0,75 I,26 3000 27,0	I,25 3,0 5000 45	2,5 4,2 I0000 90	Не устанавлив.		
I7.	Среда № 27	Гидролизат Хот-тингера (33мг% ам.аз.) Глюкоза Агар-агар	I000 I0 I5	3000 30 45	5000 50 75	I0000 I00 I50	6,I-6,3	Автоклав. при II5°С 30 мин.	
I8.	I,5% агар на гидроли-зате Хот-тингера (I35мг% ам.аз.)	Гидролизат Хот-тингера (I35мг% ам.аз.) Однозамещ. фосфат калия (KH_2PO_4)	I000 25	3000 75	5000 I25	I0000 250	5,7-5,9	-"-	
I9.	I,5% агар на гидроли-зате Хот-тингера (I40мг% ам.аз.)	Гидролизат Хот-тингера (I40мг% ам.аз.) Двузамещ. фосфат натрия (Na_2HPO_4)	I000 3	3000 9	5000 I5	I0000 30	7,8-8,0	-"-	

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
20.	Среда № 28	Гидролизат Хоттингера (33мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I00000	7,8-8,0	Автоклав. при II5°С 30 мин	
		Двузамещ. фосфат натрия (Na_2HPO_4)	3	9	I5	30			
		Агар-агар	I5	45	75	I50			
21.	Тиогликолиевая среда	Гидролизат казеина	I5	45	75	I50	7,3	Автоклав. при I2I°С 20 мин.	Гидролизат и тиогликолиевую кислоту добавляют после фильтрации.
		Дрожжевой экстракт I0%-ный	5	I5	25	50			
		Агар-агар	0,752	2,25	3,75	7,5			
		Глюкоза	5	I5	25	50			
		Цистин	0,752	2,25	3,75	7,5			
		Тиогликолиевая кислота	0,3	0,9	I,5	3			
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			
		3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МИКРООРГАНИЗМОВ							
22.	Среда Булира	Мясная вода	I000	3000	5000	I0000	7,0	Автоклав. при II5°С 30 мин.	В готовую среду добавляют 0,I% р-р нейтральрота. Разливают в пробирки с газовками.
		Пептон	I2,5	37,5	72,5	I25			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Маннит	7,5	22,5	37,5	75			
23.	Среда Гисса (сахара)	Пептонная вода	I00	200	300	400	7,7	Автоклав. при II5°С 30 мин.	Сахар к объему-0,5%, реактив Андреде - I мл на I00 мл Разливается в пробирки по 5 мл.
		Сахар (требуемый)	0,5	I	I,5	2			
		Индикатор Андреде	I	2	3	4			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24.	Пептонная вода для сахаров (полужидкая)	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	7,7		
		Пептон 1%	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар	3	9	15	30			
25.	Среда Балчева	Дистилл. вода	на 625 мл среды 500				7,2	Автоклав. при 115°С 30 мин.	Разливается по 5 мл пробирки
		Мясная вода	125	375	625	1250			
		Пептон	7,5	22,5	37,5	75			
		Цистин	0,1	0,3	0,5	1			
		Натрий хлористый	1,5	4,5	7,5	15			
		Фосфорнокислый натрий однозамещ. NaH_2PO_4	1	3	5	10			
		Сернокислый натрий Na_2SO_4	0,5	1,5	2,5	5			
		Железо лимонно-аммиачное зеленое $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,5	1,5	2,5	5			
		Феноловый красный	0,0025	0,0075	0,0125	0,025			
		Агар-агар	0,5	1,5	2,5	5			
26.	Мясо-пептонный агар с 0,2% крахмала	Мясо-пептонный агар	1000	3000	5000	10000	7,4	Автоклав. при 115°С 30 мин.	Крахмал добавляется после разведения в 25мл воды.
		Крахмал	2	6	10	20			
27.	Мясо-пептонный бульон с 0,2% KNO_3	Мясо-пептонный бульон	1000	3000	5000	10000	"		
		Калий азотнокислый KNO_3	2	6	10	20			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
28.	Среда Кларка	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	-"-		
		Глюкоза	5	I5	25	50			
		Пептон	5	I5	25	50			
		Фосфорно-кислый калий однозамещ. KH_2PO_4	5	I5	25	50			
29.	Среда Симмонса	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	7,2	Автоклав. при II5°С 30 мин.	
		Аммоний фосфорно-кислый однозамещ. $NH_4H_2PO_4$	I,5	4,5	7,5	I5			
		Серно-кислый магний $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,6	I	2			
		Цитрат натрия 3-х основн. $Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	3	9	I5	30			
		Агар-агар	20	60	I00	200			
		Бромтимол блау 0,2%	I0	30	50	I00			
30.	Агар с мочевиной	I,7-2% агарная основа	I000	3000	5000	I0000	7,3	Стерилизуется 2-х кратно текучим паром по I5-20 мин.	Разливается в стерильные пробирки
		Глюкоза	3	9	I5	30			
		50% р-р мочевины	20	60	I00	200			
		Бромтимол-блау 0,2%.	50	I50	250	500			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
3I.	Среда с сернокислым железом (для определения сероводорода)	2% агаровая основа	I000	3000	5000	I0000	7,3	Стерилиз. дробно 3 дня по 20 мин. текучим паром	Разливается в стерильные пробирки
		Сернокислое железо Fe_2SO_4	0,2	0,6	I	2			
		Гипосульфит $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	0,3	0,9	I,5	3			
		Глюкоза	I	3	5	I0			
		Фенолрот 0,2%	I2	36	60	I20			
32.	Молоко	Молоко	I000				7,I-7,2	-"-	Молоко желательно освободить отсливок
		I0% р-р углекислого натрия Na_2HCO_3	до слабощелоч. реакции						
33.	Лакмусовое молоко	Молоко свежее	I000				Не устанавлив.		
		I0% р-р углекислого натрия $NaHCO_3$	до слабо щелоч. реакции						
		Лакмусовая настойка	pH 7,I-7,2	50-I00 /5-I0%/					
34.	Мясопептонная желатина	Мясопептонный бульон	I000	3000	5000	I0000	7,4	Автоклав. при II0°C 20 мин.	Осаждается (I бел. на I л.) Разливается по 9-I0мл.
		Желатина	I00-I50	300-400	500-700	I000			

[illegible].

3, ЛИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОЛИ-ПАРАТИФОЗНОЙ ГРУППЫ БАКТЕРИЙ.

35.	Среда Каульмана	Бычья желчь (стерильная)	50	I50	250	500	Не устанавлив	Стерил. автоклав. при II5°C 30 мин.	До стер. цвет среды зеленовато-серый, после - зеленовато-коричневый.
		Среда Мюллера	I000	3000	5000	I0000			
		Водный р-р бриллиантовой зелени /I:I000/	I0	30	50	I00			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
36.	Среда Мюллера	Мел химич. чистый $CaCO_3$	4,5	I3,5	22,5	45	Не устанавл.	АВто-клав. при II5°С 30 мин. I р-р стерилиз в аппар. Коха	Колбу с мелом стерил. сухим жаром, затем добавл. МПБ Гипосульфит и р-р Люгеля добавляют перед употреблением
		МПБ (pH 7,6)	80-90	240-270	400-450	800-900			
		I. р-р гипосульфита:							
		I) кристалл. гипосульфит $Na_2S_2O_2 \cdot 5H_2O$	I0	30	50	I00			
			50	I50	250	500			
		2). Дистилл. вода	I00	300	500	I000			
		II. Р-р Люголя:	2	6	I0	20			
		I) кристалл. йод	20	60	I00	200			
		2) йодистый калий KJ	25	75	I25	250			
		3) дистилл. вода до	I00	300	500	I000			
37.	Среда Киллиана	МПБ (стерильный) pH =6,7-6,9)	I000	3000	5000	I0000			Р-р брилиантовой зелени добавл. непосредственно перед употреблением из расчета I:I0000 I:I50000 на I00мл МПБ
		0,I% водный р-р брилиантовой зелени							
38.	Селенитовая среда	Пептон	5	I5	25	50	Не устанавл.	Автоклав при II5°С 30 мин.	Перед употребл. в пробирки добавл. 0,2 мл селенисто-кисл. натр. I0% р-р
		Натрий фосфорнокислый двузамещ. Na_2HPO_4	7	2I	35	70			
		Натрий фосф. кислый однозамещ. $Na\ H_2PO_4$	3	9	I5	30			
		Лактоза	4	I2	20	40			
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			
		Натрий селенитовокислый однозамещённый	4	I2	I5	30			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
39.	Среда В.Л.Шигановой и Г.П.Калина (для накопления сальмонелл)	I.Пептон	8,4	25,2	42	84	Не устанавл.	Автоклав. при II5°С 30 мин.	После растворения ингредиентов I, 2,3 р-ров, их соединяют, разливают по пробиркам
		Натрий хлористый	I4,3	42,9	7I,5	I43			
		Дрожжевой диализат	I8	54	90	I80			
		Фосфорнокислый калий однозамещ. KH_2PO_4	2,85	8,55	I42,5	285			
		Дистилл. вода	890	2670	4450	8900			
		2.Магний хлористый кристалл. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	7I,4	2I4,2	357	7I4			
		Дистилл. вода	900	2700	4500	9000			
		3 . 0,5% водный р-р бриллиантовой зелени	I,8	5,4	9	I8			
40.	Среда Минке (для культивирования Е. коли с адгезивным антигеном)	Готовятся следующие растворы:							
		I.Буферный раствор:					7,5	Все р-ры стерилизуют отдельно Р-ры I, 2 и 5 автокл. при II5°С 30мин. Р-ры 3 и 4 в аппарате Коха.	Вместо казаминовой к-ты можно использовать ферментативный казеиново-дрожжевой гидролизат (ФКДГ), или гидролизат лактальбумина (ГЛА)
		Калий фосфор.-кисл. однозамещ. KH_2PO_4	2,72						
		Натрий фосф.-кисл. двузамещ. Na_2HPO_4	20,2						
		Вода дистилл.	до I000						
		2.Р-р микроэлементов:							
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	I0,0						
		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	I,0						
		$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,I35						
		$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,4						
		Вода дистилл.	до I000						

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
		3. Р-р казаминовой к-ты (ФКДГ, ГЛА)							
		Казаминовая к-та (ФКДГ,ГЛА)	5						
		Вода дистилл.	I00						
		4. Р-р глюкозы:							
		Глюкоза	5						
		Вода дистилл.	I00						
		5. Агар-агар ("Дифко"):							
		Агар-агар	26						
		Вода дистилл.	I000						
		Порядок приготовления: После стерилизации растворы в стерильных условиях соединяют в заданных количествах среды: I мл р-ра микроэлементов + 500 мл буферного р-ра (+50°С) + 20 мл р-ра казаминовой к-ты (ФКДГ,ГЛА) + 20 мл р-ра глюкозы +460 мл агара (+50°С).							
4I.	Магниевая среда	а) пептон	4,2	I2,6	2I	42	Не устанавл.	Авто-"а" растклав. воряют при кипении II2°С затем 20 мин, прибавляют ратворы "б" и "в".	
		натрий хлористый	7,0	2I	35	70			
		Калий фосф. кислый однозамещ. KH_2PO_4	I,5	4,5	7,5	I5			
		Дрожжевой экстракт	I0	30	50	I00			
		Вода дистилл.	890	2670	4450	8900			
		б) Магний хлор. кристалл. ($MgCl_2$)	36	I08	I80	360			
		Вода дистилл.	90	270	450	900			
		в) 0,I%-й водный р-р бриллиантовой зелени	5	I5	25	50			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
	4. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАМПИЛОБАКТЕРИЙ.								
42.	Полужидкий агар по ВГНКИ (0I5-0,2% агара)	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	7,3	Автоклав. при II5°С 30мин	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	2	6	I0	20			
		Аминопептид	50	I50	250	500			
43.	Твердый агар по ВГНКИ (2,5% агара)	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	-"-	-"-	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	25	75	I25	250			
		Аминопептид	50	I50	250	500			
44.	Полужидкий агар по ВГНКИ с I% глицина	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	7,3	Автоклав. при II5°С 30мин	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Глицин	I0	30	50	I00			
		Агар-агар	2	6	I0	20			
45.	Полужидкий агар по ВГНКИ с 3,5% натрия хлористого	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	-"-	-"-	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	35	I05	I75	350			
		Агар-агар	2	6	I0	20			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
46.	Полужидкий агар по Ф. Д. с 0,02% цистеина	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	7,3	Автоклав. при II5°С 30мин	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	5000			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Цистеин	0,02	0,06	0,1	0,2			
		Агар-агар	2	6	I0	20			
47.	Полужидкий агар по ВГНКИ с I0% желчи	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	-"-	-"-	
		Мясная вода	250	750	I250	2500			
		Печеночная вода	250	750	I250	2500			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Желчь	I00	300	500	I000			
		Агар-агар	2	6	I0	20			
48.	Производственная жидкая питательная среда на основе ФКДГ (для получения биомассы кампилобактерий)	ФКДГ	20-25	60	I00	200-250	7,0-7,I	-"-	
		Аминопептид-2	I0	30	50	I00			
		Сукцинат натрия	2,5-5	7,5-I5	I2,5-25	25-50			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			
49.	Твердая сердечно-мозговая кровяная сафранино-новобиоциновая среда для изоляции кампилобактерий и патматериала (среда ВИЭВ)	Сердечная вода	745	2235	3725	7450	7,0-7,2	Автоклав. при II7°С 25мин	Приготовление мозгового отвара: на I кг фарша из свежих мозгов КРС добавл. I л водопр. воды, настаивают I5-24ч, затем кипятят I ч, долив. до первонач. объема
		Мозговой отвар	245	735	I225	2450			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Новобиоцин 0,2% р-р (I0 мкг/мл)	5	I5	25	50			
		Сафранин Т. 0,5% водный р-р (25 мкг/мл)	5	I5	25	50			
		Цистеин	I	3	5	I0			
		Агар-агар	20	60	I00	200			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
									дистилл. водой, фильтруют через 2 слоя марли. Разливают по колбам стерилиз. автоклав. I2I°С 30-40 минут

5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БРУЦЕЛЛ.

50.	Мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГА)	Печеночная вода	500	I500	2500	5000	7,4-7,5	Автоклав. при II5°С 30мин	Осаждается белком (I белок на I л)
		Мясная вода	500	I500	2500	5000			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Глицерин	20	60	I00	200			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Агар-агар	20	60	I00	200			
5I.	Мясо-пептонный печеночный-глюкозно-глицериновый бульон (МППГБ)	Готовится также, как МППГА, но без добавления агара					-"-		
52.	Агар Альбини	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	7,2-7,3	Автоклав. при II5°С 30мин	Глюкоза и бисульфат натрия добавл. перед разливом
		Дрожжевой экстракт	20	60	I00	200			
		Пептон	20	60	I00	200			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Бисульфат натрия $NaSH.2H_2O$	0,I	0,3	0,5	I			
		Агар-агар	30	90	I50	300			
		Глюкоза	I	3	5	I0			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
53.	Среда Вейбридж-ка	Дистилл. вода	835	2502	4I75	8350	7,8 при	Автоклав. II5°С 30мин	Осаждается яичным белком (I белок на I л) фильтруют через ватно-марлевый фильтр
		Мясная вода	I65	495	825	I650			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Агар-агар	30	90	I50	300			
54.	Агар "Д"	Водопроводная вода	I000	3000	5000	I0000		Автоклав. при II5°С 30мин.	В агар для флаконов, матрасов добавляют 0,5% агара для увеличения плотности
		Сухой питательный агар "Д"	50	I50	250	500			
		Глицерин	20	60	I00	200			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
55.	Печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГГА)	Печеночная вода	I000	3000	5000	I0000	7,2	Автоклав. при II5°С 30мин	
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	25	75	I25	250			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Глицерин	20	60	I00	200			
56.	Печеночно-глюкозно-глицериновый бульон (ПГГБ)	Готовится аналогично ПГГА, но без добавл. агара					-"-	-"-	
57.	Картофельный агар	см.стр.25					7,2		
58.	Сывороточно-декстрозный агар	Дистилл. вода	835	2505	4I75	8350	7,8	Добавл.	Перед употреблением сыворотку КРС или лошади I0% р-р декстрозы, I% профильтрован. через фильтры Зейтца
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Мясная вода	I65	495	825	I650			
		Агар-агар	20	60	I00	200			
		Глюкоза или декстроза	I0	30	50	I00			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
59.	Плотный печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар	Печеночная вода	I000	3000	5000	I0000	7,2 при 20°	Автоклав. II5°С 30мин	Перед употреблением добав. сыворотку КРС I0-20% или I0-15% аминопептида.
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	20	60	I00	200			
		Сода двууглекислая 20% р-р	I7	5I	85	I70			
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Глицерин	20	60	I00	200			
60.	Полужидкий печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар	Готовится так же, как плотная Агар-агара добавл. I,5-2 г					-"-	-"-	-"-
61.	Эритрит агар	Готовая питательная среда для выделения бруцелл.							

6. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ.

62.	Картофельный бульон	Водопроводная вода	II00	3300	5500	II000	7,0	Автоклав. II5°С 30мин
		Картофель очищенный	500	I500	2500	5000		
		Пептон	I0	30	50	I00		
		Натрий хлористый	5	I5	25	50		
		Глицерин	30	90	I50	300		
		Глюкоза	I0	30	50	I00		

63.	Среда Петрань-Аун	Из расчета на яйца			Не устанавливается	В аппарате для свертыван. сыворотк при 85°С 40 мин. 2 дня.
		Молоко	300	600		
		Крахмал	I2	24		
		Пептон	2	4		
		Клубни картофеля	2 шт	4 шт		
		Глицерин	24	48		
		Малахитовая зелень 2% р-р водный	20	40		
		Цельные яйца	8 шт	I6 шт		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
64.	Среда Френсиса	Мясная вода	1000	3000	5000	10000	7,4	Автоклав. 115°С 30мин	
		Пептон	40	120	200	400			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Глицерин	100	300	500	1000			
65.	4% глицериновая вода	Дистилл. вода	1000	3000	5000	10000	7,2	Автоклав. 110°С	
		Глицерин	40	120	200	400			
66.	Картофельная среда Павловского	В пробирки РУ наливается 4% глицериновая вода (pH=7,0) и кладется картофель, вырезанный кусочком, предварительно выдержанный в течение часа в 10% растворе соды.						текучим паром 20 минут, автоклавированием при 110°С 5-7 минут	
67.	Среда Левенштейна-Йенсена	Дистилл. вода	600	1800	3000	6000	В аппарате свертыв. сыворотки при 85°С 40 мин 2 дня		Смесь перемешивается со стеклянными бусами
		Сернокислая магнезия $MgSO_4.7H_2O$	0,24	0,72	1,2	2,4			
		Лимоннокислая магнезия $MgC_6H_5O_7$	0,6	1,8	3,0	6,0			
		Аспарагин	3,6	10,8	18	36			
		Глицерин	12	36	60	120			
		Крахмал	30	90	150	300			
		Малахитовая зелень водный р-р 2%	20	60	100	200			
		Калий фосфорнокислый одно замещен. (KH_2PO_4)	2,4	7,2	12	24			
		Яичная масса	1000	3000	5000	10000			
68.	Полужидкая среда на основе полусинтет. среды Школьниковой (для культивирования туберкулезных микобактерий)	Калий фосфорнокислый однозамещ. KH_2PO_4	1,5	4,5	7,5	15	Не устанавл.	Автоклав. 120°С 30мин	За 3 дня перед употреблением на 700 мл среды-100мл 20% сахарозы и 100мл сыв-ки КРС
		Натрий фосфорнокислый двузамещен. Na_2HPO_4	2,5	7,5	12,5	25			
		Сернокислый магний ($MgSO_4$)	0,5	1,5	2,5	5			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
		Лимонно-кисл.натрий $Na_2C_6H_5O_7$. $.2H_2O$	I,5	4,5	7,5	I5			
		Лимонно-кислое аммиачное железо $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,05	0,I5	0,25	0,5			
		L-аспарагин	I	3	5	I0			
		Глицерин	30	90	I50	300			
69.	Среда Гельберга	Яйца целые	6 шт				Не уста-навл.	В аппарате для сверт. сывороток при 85° 40 мин 2 дня	Перемешивается в колбе с бусами, разлив. по пробиркам
		Желтки	4 шт						
		Молоко	I00						
		Картофельный отвар	I00						
		Солевой р-р стерил.	I00						
		Малахитовая зелень 2% водный р-р	7,5						
		Солевой р-р:							
		Калий фосф. кислый двузамещ. K_2HPO_4	I	3	5	I0		Солевой р-р и картофельный отвар стерилизуют: доводят автоклав до I20° и выключ.	Разливают во флаконы по II0 мл.
		Натрий лимонно-кислый $Na_2C_6H_5O_7$. $.2H_2O$	I	3	5	I0			
		Магний сернокислый $MgSO_4.7H_2O$	I	3	5	I0			
		Пептон	6	I8	30	60			
		Глицерин	30	90	I50	300			
		Вода дистилл.	I000	3000	5000	I0000			

Картофельный отвар – I кг картофеля кипятят в 2л дистилл. воды I5 мин. Отстаивают и верхний слой фильтруют через ватно-марл. фильтр. Разливают во флаконы по II0 мл.

Молоко – Молоко центрифугируют или предварит. отстаивают в холодильнике, снимают сливки, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по II0 мл во флаконы. Стерилизуют в автоклаве паром при 1атм 10 мин, или в аппарате Коха 2 дня текучим паром 30–40 мин.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
70.	Среда Калфина	Желтки яичные	I50	450	600	I500	8,2	30мин текучим паром	Перед добавлением малахит. зелени подщелач. 5% KOH до светло-зеленой окраски (8,2)
		Глицерин	7	2I	35	70			
		Картофельный отвар:	I/2 картоф.клубня натереть на терке + 200 мл дистилл. воды, подщелачивают р-ром бромтимол.блау до зеленой окраски.						
		Картофельный отвар	50	I50	250	500			
		Натрий фосфорнокислый двузамещ. I0% р-р Na_2HPO_4	20	60	I00	200			
		Магний сернокислый I0% р-р $MgSO_4.7H_2O$	2	6	I0	20			
		Малахитовая зелень I% водный р-р	20	60	I00	200			
		Дистилл. вода	750	2250	3750	7500			
71.	Среда Шула	Натрий фосф.кислый двузамещ. Na_2HPO_4	I,25	3,75	6,25	I2,5	Не устанавл.	Автоклав при I20°C 30мин	
		Калий фосфорн.кисл. однозамещ. KH_2PO_4	0,75	2,25	3,75	7,5			
		Магний сернокисл. $MgSO_4.7H_2O$	0,I5	0,45	0,75	I,5			
		Натрия цитрат $Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$	I,25	3,75	6,25	I2,5			
		Ферроаммоний цитрат $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,025	0,075	0,I25	0,25			
		Казеина гидролизат I0% водный раствор	25	75	I25	250			
		Глицерин	I5	45	75	I50			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Малахитовая зелень 2% водный раствор	I	3	5	I0			
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			
72.	Среда финн-II	I Яичная масса	I2 яиц				Не установл.	Автоклав.при I20°С 20мин	
		II Солевой р-р:							
		Магний сернокислый $MgSO_4.7H_2O$	0,5						
		Натрия цитрат $Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$	I						
		Квасцы железоаммиачные $FeNH_4C_6H_5O_7$	0,05						
		Калий фосф. кислый одноамещ. KH_2PO_4	20						
		Аммоний цитрат одноамещ. $NH_4C_6H_7O_7.H_2O$	5						
		Натрий глутаминовокислый однозамещ.	I0						
		Глицерин	20						
		Дистилл.вода	до Iл						
73.	Среда Сотона	Аспарагин	5	I5	25	50	7,2	Автоклав.при I20°С 20мин	
		Глицерин	50	I50	250	500			
		Лимонная к-та $C_6H_8C_7.H_2O$	4	I2	20	40			
		Калий фосф. кисл.двузамещ. K_2HPO_4	5	I5	25	50			
		Магний сернокислый $MgSO_4.7H_2O$	0,5	I,5	2,5	5			
		Железо сернокислое $Fe_2(SO_4)_3$	0,05	0,I5	0,25	0,5			
		Аммоний цитрат двузамещ. $(NH_4)_2C_6H_6O_7$	2	6	I0	20			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
		Цинк серно-кислый $ZnSO_4$	0,I	0,3	0,5	I			
		Вода дистилл.	до I л						
74.	Среда Гарольда	Пептон	9				7,5	Авто-клав. при I20°С 25мин	Микобактин добавляется после установления pH по каплям
		Натрий хлористый	4,5						
		Агар-агар	I5,3						
		Мясной экстракт	2,7						
		Микобактин	27						
		Яичные желтки	6 шт.						
		Малахитовая зелень 2% водный раствор	5,I						
		Дистилл. вода	870						
		7. СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ.							
75.	Бульон Мартена	Пептон Мартена	500	I500	2500	5000	8,2	Автоклав. при I15°С 30мин	Фильтруется через бумажный фильтр
		Мясная вода	500	I500	2500	5000			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
76.	Агар Мартена	Пептон Мартена	500	I500	2500	5000		"	
		Мясная вода	500	I500	2500	5000			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Агар-агар	30	90	I50	300			
77.	Бульон Эдвара	Водопроводная вода	500	I500	2500	5000	8,4	Автоклав. при I15°С 30мин	Осаждается (белок на I л) Фильтр. через ватно-марлевый фильтр
		Сердечная вода	500	I500	2500	5000			
		Пептон	I0	30	50	I00			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
78.	Бульон из перевара бычьего сердца	Гидролизат бычьего сердца (ам. азот не менее 600мг%)	200	600	I000	2000	7,8	_"_	
		Мясная вода	400	I200	2000	4000			
		Водопр. вода	400	I200	2000	4000			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
79.	Среда на основе ферментативного мясного гидролизата на р-ре Хенкса для культивирования микоплазм из культур клеток (полужидкая)	ЭГМ-С	20	60	I00	200	8,0-8,2		Перед употреблением добавляют дрожжевой экстракт (I0%) и сыворотку КРС или лошади (I0-20%).
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			
		Р-р Хенкса:							
		NaCl	8,0	24	40	80			
		KCl	0,4	I,2	2	4			
		$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,I85	0,56	0,97	I,85			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,6	I,0	2,0			
		$NaHCO_3$	0,35	I,05	I,75	3,5			
		$MgCl \cdot 6H_2O$	0,I	0,3	0,5	I,0			
		$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06	0,I8	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,I8	0,3	0,6			
		Глюкоза	I,0	3,0	5,0	I0,0			
		Агар "Дифко"	3	9	I5	30			
80.	0,3% агар из перевара бычьего сердца	Бульон из перевара бычьего сердца	I000	3000	5000	I0000	7,8	Автоклав. при II0°С 30 мин.	
		Агар-агар	3	9	I5	30			
8I.	2% агар из перевара бычьего сердца	Бульон из перевара бычьего сердца	I000	3000	5000	I0000	-"-	-"-	Можно просветлить белком куриного яйца-1 белок на 1 л среды
		Агар-агар	20	60	I00	200			
82.	Среда Хейфлика	Агар "Дифко" I,5-2%	700	2I00	3500	7000	8,0	Автоклав. при II5°С 30 мин.	Сыворотку добавляют после стерилизации
		Сыв-ка крови лошади инактивированная	200	600	I000	2000			
		Дрожжевой экстракт 250 р-р	I00	300	500	I000			
83.	Среда ВИЭВ	Пептон Мартена	500	I500	2500	5000	8,0	Автоклав. при I20°С 30 мин.	Перед употреблением добавляют 20% стерил. сыв-ки и I0% дрожж. экстракта.
		Мясная вода	500	I500	2500	5000			
84.	Плотная среда ВИЭВ	Пептон Мартена	500	I500	2500	5000	-"-	-"-	-"-
		Мясная вода	500	I500	2500	5000			
		Агар-агар	20	60	I00	200			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
85.	Сре[illegible] Г.Н.[illegible], И.Погани	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	8,0-8,2	Автоклав. при I20°С 30мин	Перед употребл. добавляют 20% стер сыв-ки и I0% дрож. экстракта
		Натрий хлористый	2,5	7,5	I2,5	25			
		Натрий фосфорно-кисл. двузамещ. Na_2HPO_4	2,5	7,5	I2,5	25			
		Фенол-рот	0,024	0,072	0,I2	0,24			
		Пептон	0,075	0,225	0,375	0,75			
		Дрожжевой экстракт	200	600	I000	2000			
		Сыв-ка крови лошади	200	600	I000	2000			
86.	Среда Л.Штипкович	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	6,7-7,8	Автоклав. при II5°С 30мин	— " —
		Бакто-агар с триптозой	20	60	I00	200			
		Мальтоза	25	75	I25	250			
		Натрий хлористый	5	I5	25	50			
		Натрий фосф. кисл. двузам. Na_2HPO_4	2,5	7,5	I2,5	25			
		Фенол-рот	0,024	0,072	0,I2	0,24			
		Дрожжевой экстракт	I0	30	50	I00			
87.	Среда Р.Р.Чалквиста	Бульон "Дифко" (ППЛО)	22,5	67,5	II2,5	225	8,0	-"-	— " —
		Глюкоза	I0	30	50	I00			
		Дифосфопиридиннуклеотид	0,02	0,06	0,I	0,2			
		Цистеин гидрохлорид	20	60	I00	200			
		Фенол-рот	50	I50	250	500			
		Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000			

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 устанавл.		Глюкоза добавляется после кипячения. Фильтруется через бумажные фильтры
		Азотнокислый натрий $NaNO_3$	2	6	10	20	Автоклав. при 115°С 30 мин.		
		Калий фосф.кисл. однозамещ. KH_2PO_4	1	3	5	10			
		Сернокислый магний $MgSO_4.7H_2O$	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 осаждается. Фильтруется через ватно-марл. фильтр
		Агар-агар	25	75	125	250	Автоклав. при 115°С 30 мин.		
90.	Сусло-агар	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	7,8	Автоклав. при 110°С 30мин	При разливе в матрасы (спеллает) добавляется 2% агара
		Сусло	500	1500	2500	5000			
		Агар-агар	25	75	125	250			
91.	Сусло-агар с пептоном	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	-"-	-"-	-"-
		Сусло	500	1500	2500	5000			
		Агар-агар	25	75	125	250			
		Пептон	5	15	25	50			
92.	Сусло-агар с ферментативным гидролизатом мышц (ФГМ-С)	Водопроводная вода	500	1500	2500	5000	-"-	-"-	-"-
		Сусло	500	1500	2500	5000			
		Агар-агар	25	75	125	250			
		ФГМ-С	5	15	25	50			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
93.	Сусло-агар с ферментативным казеиново-дрожжевым гидролизатом (ФКДГ)	Водопров. вода	500	1500	2500	5000	7,6	Автоклав. при 110°С 30мин	При разливе в матрасы (сползает) агара добавляется 3%
		Сусло	500	1500	2500	5000			
		Агар-агар	25	75	125	250			
		ФКДГ	5	15	25	50			
94.	Среда Сабуро	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000	6,2	Автоклав. при 115°С 30мин	
		Пептон	10	30	50	100			
		Мальтоза (глюкоза)	40	120	200	400			
		Агар-агар	18	54	90	180			
95	Картофельный агар	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000	Не устанавл.	Автоклав. при 115°С 30мин	
		Очищенный картофель	200	600	1000	2000			
		Агар-агар	20	60	100	200			
96.	Среда Ван-Интерсона	Водопроводная вода	1000	3000	5000	10000	-"-	-"-	
		Аммоний азотнокислый NH_4NO_3	0,5	1,5	2,5	5,0			
		Калий фосф. кислый однозамещ. KH_2PO_4	0,5	1,5	2,5	5,0			
		9. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ.							
97.	Среда Петровского (для культивирования трихомонад)	Водопроводная вода	750	2250	3750	7500	7,7	Автоклав. при 115°С 30мин	Разливается в пробирки по 9 мл под вазелиновым маслом.
		Печеночная вода	250	750	1250	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		мальтоза	10	30	50	100			

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
98.	Среда Сумцова-Манжос для культивирования балантидий	Дистилл. вода	I000	3000	5000	I0000	Не устанавл.		
		Натрий хлористый	7	2I	35	70			
		Натрий фосф. кислый двузамещ. Na_2HPO_4	I	3	5	I0			
		Калий фосф.-кислый однозамещ. KH_2PO_4	0,4	I,2	2	4			

Порядок приготовления.

Раствор стерилизуется кипячением I5 мин., дважды фильтруется через фильтровальную бумагу, после фильтрации объем доводится до первоначального, затем разливается в пробирки по 8 мл, в каждую пробирку добавляют рисовый крахмал на кончике ножа, после чего стерилизуют при I2I°С 30 мин. Непосредственно перед посевом в пробирки, которые должны храниться при +4°С в стерильных условиях добавляют по 0,2 мл дизата слизистой оболочки толстого отдела кишечника свиней или по I мл ФИС.

99.	Питательная среда для изоляции и культивирования трепонем	Гидролизат Хоттингера (I30-I40 мг% ам.аз)	2/3 объема сосуда	7,0-7,2 Устанавл. во время барботирования	Гидролизат готовится из муки сои, гороха или слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Из 3-4 кг поджелудочной железы готовят фарш перемолов его дважды на мясорубке. Бобы сои и гороха размалывают, заливают дистиллированной водой I:3 муку и кипятят 20 мин при постоянном помешивании. После остывания до 40°С I0% NaOH устанавливают pH 7,8-8,0 и вносят в кашицу I0% подже-
		Добавляют по весу:			
		Резазурин (индикатор редукции кислорода)	0,001%		
		Натрий хлористый	0,5%		
		Глюкоза	0,25%		
		Пептон	I%		
		Бактоагар "Дифко"	2%		

О редукции кислорода в среде судят по изменению цвета резазурина - от голубого к бесцветному через розовый. К концу кипячения среда должна приобрести естественный цвет (цвет до прибавления резазурина). Затем среду моментально закупоривают стерильной резиновой пробкой, вносят в бокс и пропускают через нее обескислороженный углекислый газ или азот в течение I5 мин. К концу барботирования в среду вносят 0,05% цистеина гидрохлорида, сосуд моментально закупоривают пробкой и охлаждают в ледяной бане.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Среду сохраняют при Т=4°С. Непосредственно перед применением автоклавируют при 0,5 атм.30 мин. Перед посевом среду остужают до 45-50°С, 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°С в течение 1-2 недель. Перед применением полужидкий агар автоклавируют, остужают барботированием до 45-50°С 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.

лудочной железы и 2% хлороформа. Смесь разливают в стеклянные бутыли на 2/3 их объема, плотно закрывают и ставят при 36°С, т.к. при гидролизе pH смещается в кислую сторону его доводят до 7,8-8,0 10%/ным р-ром NaOH через 1,2-3 ч и далее ежедневно в течение 3-4 суток один раз в день. После прекращения нарастания аминного азота (300-400 мг%) бутыли с перевар ром хранят при комнатной температуре.

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°С 30мин	
		Печеночная вода	500	1500	2500	5000			
		Гидролизат Хоттингера (180мг% 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-Тароцци с 0,1% агара и кусочками мозга овцы	Водопроводная вода	375	1125	1875	3750	8,4 при	Автоклав. при 110°С 30мин	Разливается по 9 мл в пробирки с кусочками мозга овцы, сверху наливается вазелиновое масло.
		Мясная вода	375	1125	1875	3750			
		Печеночная вода	250	750	12500	2500			
		Пептон	10	30	50	100			
		Натрий хлористый	5	15	25	50			
		Агар-агар	1	3	5	10			
	См. также среда Китт-Тароцци, 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°С 30мин
		Твин-80	0,006	0,018	0,03	0,06		
		Натрий цитрат	0,05	0,15	0,25	0,5		
		$Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$						
		Натрий сукцинат $\cdot 6H_2O$	2,5	7,5	12,5	25		
		$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	2,5	7,5	12,5	25		
		KH_2PO_4	1,0	3	5	10		
		NH_4Cl	5	15	25	50		
		$NaHCO_3$	0,5	1,5	2,5	5		
		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,3	0,9	1,5	3		
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,03	0,05	0,1		

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
	Среда для культивирования коринебактерий (ВИЗВ)	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,006	0,0I8	0,03	0,06	Не устанавл.		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0I5	0,045	0,075	0,I5			
		$CaCl_2 \cdot 4H_2O$	0,0I5	0,045	0,075	0,I5			
		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,075	0,225	0,375	0,75			
		$CuSO_4 \cdot 2H_2O$	0,045	0,I35	0,225	0,45			
		ЭДТА	0,005	0,0I5	0,025	0,05			
		Вода дистилл.	I000	3000	5000	I0000			

I2. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЕМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.

I02.	Среда для культивирования H.pertussis	б-н Хоттингера (200мг% ам.аз.)	I000	3000	5000	I0000	Не устанавл.	Вместо ДФН можно взять I0% дрожжевого экстракта
		ДФН (дифосфопиридиннуклеотид) I0мкг/мл	30	60	I50	300		
		Глюкоза	4	I2	20	40		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ I0 мкг/мл						

IУ. 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 М., 1983).

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

Для оценки эффективнорсти питательных сред ВГНКИ предлагает определение концентрации микробной взвеси через 24 ч инкубации по показателю оптической плотности (Е) на ФЭКе при длине волны 620-640 нм в кювете с рабочей длиной 5 мм (ГОСТ I3805-76). В качестве нижних границ накопления бактериальных клеток могут быть рекомендованы следующие значения Е для тест-культур:

Staphylococcus aureus	Лосманов	- 0,4
Escherichia coli	675,0,	- 0,5
Streptococcus faecalis	6783	- 0,3
Streptococcus pyogenes	Dick I	- 0,I2
Shigella flexneri	Ia 8516	- 0,I5
Corynebacterium diphtheriae	I9II	- 0,I2

II. РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

В В Е Д Е Н И Е

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

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

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

Таблицы пересчета: электропроводимость - удельное сопротивление прилагается.

Соли ратсворяют 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 (ФКДГ), среда Игла и раствор трипсина предварительно фильтруют через 5-10 слоев фильтровальной бумаги, затем через пластины ЕКЅ-1 и стерилизуют через пластины СФ, ЕКЅ-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°С на 5 суток, а затем на 10 дней при 16-18°С и после этого срока среды используют.

Раствор трипсина выдерживают в термальной комнате при 37°С I сутки, затем хранят при температуре 4°С в течение месяца или в замороженном состоянии в течение нескольких месяцев.

ТАБЛИЦА ПЕРЕСЧЕТА ПРОВОДИМОСТЬ - СОПРОТИВЛЕНИЕ.

мS (микросименс)	Ом	Ком	Мом
2000	500	0,5	0,0005
I000	I000	I	0,00I
500	2000	2	0,002
200	5000	5	0,005
I00	I0000	I0	0,0I
50	20000	20	0,02
25	40000	40	0,04
20	50000	50	0,05
I0	I00000	I00	0,I
5	200000	200	0,2
3,33..	300000	300	0,3
2,5	400000	400	0,4
2,0	500000	500	0,5
I,66..	600000	600	0,6
I,428	700000	700	0,7
I,25	800000	800	0,8
I,II..	900000	900	0,9
I,0	I000000	I000	I
0,5	2000000	2000	2
0,33	3000000	3000	3
0,25	1000000	4000	4
0,2	5000000	5000	5
0,I66г.	6000000	6000	6
0,I42	7000000	7000	7
0,I25	8000000	8000	8
0,II..	9000000	9000	9
0,I	I0000000	I0000	I0
0,05	20000000	20000	20
0,038*	26000000	26000	26

*

I Солевые растворы

№№ пп	Название р-ра	Название ингредиентов	К-во ингредиентов (в г) на объем (в л) 1л	5л	10 л	pH до стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Раствор Хенкса для приготовления питательных сред	NaCl	8	40	80	7,1-7,0	Автоклавирован. при 0,5 атм. 30мин без $CaCl_2$ $MgCl_2$ и глюкозы. Или через пластины СФ, ЕКБ-2, или миллипоров. фильтр 0,22 мкм	
		KCl	0,4	2,0	4			
		$CaCl_2$ б/в	0,14	0,7	1,4			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,5	1			
		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	0,5	1			
		$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		$NaHCO_3$	0,0	3	6			
		Глюкоза	1	5	10			
		Фенол-рот, в/р 0,5%	2мл	10мл	20мл			
2.	Раствор Хенкса для промывания тканей	NaCl	8,0	40	80	7,0-7,1	Автоклав. при 0,5атм 30 мин	
		KCl	0,4	2,0	4			
		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	0,5	1			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,5	1			
		$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		Фенол-рот в/р 0,5%	2мл	10мл	20мл			
3.	Раствор Эрла для приготовления питательных сред	NaCl	6,8	34	68	7,1-7,2	Автоклавир. при 0,5 атм. 30 мин без $CaCl_2$ и глюкозы или через пластины СФ, ЕКБ-2 или миллипоров. фильтр 0,22 мкм	
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$ б/в	0,2	1	2			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,5	1			
		$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	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	Автоклавиров. при 0,5 атм 30 мин или СФ, ЖБ-2 или миллипоров. фильтры 0,2 мкм	
		KCl	0,2	1,0	2			
		$CaCl_2$	0,2	1	2			
		$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	0,5	1			
		$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,25	0,5			
		Глюкоза	1	5	10			
		$NaHCO_3$	1	5	10			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	10мл	20мл			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
5.	0,02% р-р Версена (трилонБ)	NaCl KCl $Na_2HPO_4.2H_2O$ KH_2PO_4 Версен	8 0,2 I,I5 0,2 0,2	40 I 5,75 I I	80 2 II,5 2 2	6,8	Автоклавир. при 0,7 атм 30мин	Перед работой довести pH р-ра до 7,3-7,4 двууглекислой содой
6.	7,5% р-р соды	$NaHCO_3$	75	375	-		Автоклав. 0,7атм 30мин	
7.	I0% р-р однозамещен. фосфата калия	KH_2PO_4	I00	500	-		Автоклав. 0,7атм 30мин	
8.	0,5% р-р фенолрота (водорастворимый)	Фенол-рот	0,5 г / I00мл	I г / 200мл	I,5г / 300мл			Для получения лучшего роста вовремя добавить на кончике скальпеля двууглекислую соду ($NaHCO_3$)
9.	Фосфатно-буферный солевой раствор (ФБР)	NaCl KCl $MgCl_2.6H_2O$ $Na_2HPO_4.2H_2O$ KH_2PO_4	8,0 0,2 0,I I,42 0,2	40,0 I,0 0,5 7,I I,0	80,0 2,0 I,0 I4,2 2,0	6,8	Автоклав. при 0,5атм 30мин	
I0.	0,2% р-р трипсина "Дифко" на фосфатном буферном р-ре (ФБР)	NaCl KCl $MgCl_2.6H_2O$ $Na_2HPO_4.2H_2O$ KH_2PO_4 Фенол-рот 0,5%	8 0,2 0,I I,42 0,2 2мл	40 I 0,5 7,I I I0мл	80 2 I I4,2 2 20мл	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕК5-I. Стерилизация через пласт. С2, ЕК5-2, миллипоровые 0,22мкм	Перед работой довести pH р-ра до 7,4-7,6 двууглекислой содой
		Трипсин ("Дифко")	2,5	I2,5	25,0			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стрептомицин	I00мг	500 мг	I000 мг (I,0 г)			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl	8	40	80	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2, или миллипоровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,4-7,6 двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		Глюкоза (медицин)	I	5	I0			
		Фенолкрот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Трипсин "Дифко" или Олайнского з-да химреактивов, НПО "Биолар", Латв.ССР	2,5	I2,5	25			
			5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (I г)			

2. Питательные среды.

I.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Хенкса	NaCl	8	40	80	7-7,I	Предвар. фильтр. через пластины ЕК5-I. Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	Перед работой довести pH р-ра до 7,2 и 7,3 р-ром двууглекислой соды
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$ (безводн.)	0,I4	0,7	I,4			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$MgCl_2.6H_2O$	0,I	0,5	I			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		$NaHCO_3$	0,6	3	6			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Лактальбумин	5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стрепто-мицин	I00мг	500 мг	I000 мг (I г)			
2.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Эрла	NaCl	6,8	34	68	7-7,I	Предварительн. фильтрация через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или миллипоровый фильтр	Перед работой довести pH до 7,2-7,3 7,5% двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$(б/в)	0,2	I	2			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$NaH_2PO_4.H_2O$	0,I25	0,625	I,25			
		$NaHCO_3$	I,2 (до 2,2)	6	I2			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Лакт	5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.		0,22 мкм	
		Стептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (1,0г)			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	0,3% р-р гидролизата мышечных белков на р-ре Хенкса (ЭГМ-С)	NaCl	8	40	80	6,7-6,8	Предварительная фильтр. через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины ЕК5-2 или миллипоров, фильтр 0,22мкм	Перед работой довести pH р-ра до 7,2-7,3 двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$(б/в)	0,I4	0,7	I,4			
		$MgCl_2.6H_2O$	0,I	0,5	I			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		$NaHCO_3$	0,I5	0,75	I,5			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Гидролизат мышечных белков	3г	I5г	30г			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стрептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (I г)			

№№ пп	Название питательн. среды	Колич-во ингредиентов (в г) на объем среды (в л)	pH до стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
4	Питательная среда Игла сухая, (производство Олайнского завода химреактивов, НПО "Биолар", Латв.ССР	Одна упаковка сухой среды Игла состоит из 2-х флаконов, расчитанных для приготовления I0л питательной среды. Для приготовления среды Игла необходимо: I. Растворить содержимое флакона № I (смесь аминокислот, витаминов, глюкозы, фенолового красного и неорганических солей), в I л деминерализованной воды. 2. Растворить флакон № 2 (натрий двууглекислый в Iл. бидистиллированной воды.) 3. Предварительно профильтровать содержимое флакона № I через фильтр ЕК5-I и довести объем деминерализованной водой до 8 л., прилить раствор флакона № 2 и довести содержимое бутыли до I0 л.	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
II.	0,25% р-р трипсина на р-ре Хенкса	NaCl	8	40	80	6,8	Предварительная фильтрация через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2, или миллипоровый фильтр 0,22 мкм	Перед работой довести pH до 7,4-7,6 двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		Глюкоза (медицин)	I	5	I0			
		Фенолрот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Трипсин "Дифко" или Олайнского з-да химреактивов, НПО "Биолар", Латв.ССР	2,5	I2,5	25			
			5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (I,0г)			

2. Питательные среды.

I.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Хенкса	NaCl	8	40	80	7-7,I	Предвар. фильтр. через пластины ЕК5-I. Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или милли поровый фильтр 0,22мкм.	Перед работой довести pH р-ра до 7,2 и 7,3 р-ром двууглекислой соды
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$ (безводн.)	0,I4	0,7	I,4			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$MgCl_2.6H_2O$	0,I	0,5	I			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		$NaHCO_3$	0,6	3	6			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Лактальбумин	5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стрептомицин	I00мг	500 мг	I000 мг (I г)			
2.	0,5% гидролизат лактальбумина на р-ре Эрла	NaCl	6,8	34	68	7-7,I	Предварительн.фильтрация через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЖС-2 или миллипоровый фильтр	Перед работой довести pH до 7,2-7,3 7,5% двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$(б/в)	0,2	I	2			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$NaH_2PO_4.H_2O$	0,I25	0,625	I,25			
		$NaHCO_3$	I,2 (до 2,2)	6	I2			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Лакт	5	25	50			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.	0,22 мкм		
		Стептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (I,0г)			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	0,3% р-р гидролизата мышечных белков на р-ре Хенкса (ВГМ-С)	NaCl	8	40	80	6,7-6,8	Предварительная фильтр. через пластины ЕК5-I Стерилизация через пластины ЕК5-2 или миллипоров. фильтр 0,22мкм	Перед работой довести pH р-ра до 7,2-7,3 двууглекислой содой
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$(б/в)	0,I4	0,7	I,4			
		$MgCl_2.6H_2O$	0,I	0,5	I			
		$MgSO_4.7H_2O$	0,I	0,5	I			
		$Na_2HPO_4.2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		$NaHCO_3$	0,I5	0,75	I,5			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Фенол-рот 0,5%	2мл	I0мл	20мл			
		Гидролизат мышечных белков	3г	I5г	30г			
		Пенициллин	I00тыс.ед.	500тыс.ед.	Iмлн.ед.			
		Стрептомицин	I00мг	500мг	I000 мг (I г)			

№№ пп	Название питательн. среды	Колич-во ингредиентов (в г) на объем среды (в л)	pH до стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
4	Питательная среда Игла сухая, (производство Олайнского завода химреактивов, НПО "Биодар", Латв.ССР	Одна упаковка сухой среды Игла состоит из 2-х флаконов, расчитанных для приготовления I0л. питательной среды. Для приготовления среды Игла необходимо: I. Растворить содержимое флакона № I (смесь аминокислот, витаминов, глюкозы, фенолового красного и неорганических солей), в I л деминерализованной воды. 2. Растворить флакон № 2 (натрий двууглекислый в Iл. бидистиллированной воды.) 3. Предварительно профильтровать содержимое флакона № I через фильтр ЕК5-I и довести объем деминерализованной водой до 8 л., прилить раствор флакона № 2 и довести содержимое бутыли до I0 л.	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 или миллипоровый фильтр 0,22мкм	

№№ пп	Название питательн. сред"	Названвие ингредиентов	К-во ингредиентов (в г) на объем воды (в л)			pH до стерилизац.	Режим стерилизации
			Iл	5л	IOл		
5.	Среда Игла МЕМ	NaCI	6,8	34	68	7,3-7,4	Предварительная фильтрация через ЕК5-I Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2 и или миллипоровый фильтр 0,22 мкм
		KCI	0,4	2	4		
		$CaCl_2$ б/в	0,2	I	2		
		$MgCl_2.6H_2O$	0,2	I	2		
		$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,I5	0,75	I,5		
		$NaHCO_3$	2	I0	20		
		Глюкоза	I	5	I0		
		Аргинин	0,I05	0,525	I,05		
		Гистидин	0,03I	0,I55	0,3I		
		Изолейцин	0,052	0,260	0,52		
		Лейцин	0,052	0,26	0,52		
		Лизин	0,058	0,29	0,58		
		Фенилапин	0,032	0,I6	0,32		
		Треонин	0,048	0,249	0,48		
		Триптофан	0,0I	0,05	0,I		
		Валин:	0,046	0,23	0,46		
		Цистин	0,024	0,I2	0,24		
		Метионин	0,0I5	0,075	0,I5		
		Тирозин	0,036	0,I8	0,36		
		Глютамин	0,292	I,46	2,92		
		Тиамин	0,00I	0,005	0,0I		
		Рибофлавин	0,000I	0,0005	0,00I		
		Холинхлорид	0,00I	0,005	0,0I		
		Пантотенат кальция	0,00I	0,005	0,0I		
		Инозит	0,002	0,0I	0,02		
		Фолиевая к-та	0,00I	0,005	0,0I		
		Никотинамид	0,00I	0,005	0,0I		
		Пиридоксаль	0,00I	0,005	0,0I		

I	2	3	4	5	6	7	8	9
6.	0,5% ферментативный казеиново-дрожжевой гидролизат (ФКДГ) на р-ре Хенкса	NaCl	8	40	80	7,1-7,2		Перед работой довести pH до 7,2-7,3 7,5% р-ром двууглекислой соды
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$ б/в	0,4	0,7	1,1			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,5	1			
		$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1	0,5	1			
		$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06	0,3	0,6			
		KH_2PO_4	0,06	0,3	0,6			
		Na_2HCO_3	0,6	3	6			
		Глюкоза	1	5	10			
		Фенол-рот 0,5%	2 мл	10 мл	20 мл			
		ФКДГ	5	25	50			
		Пенициллин	100тыс.ед.	500тыс.ед.	1млн.ед.			
		Стрептомицин	100 мг	5%% мг (1г)	1000 мг			

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9
7.	Готовая питательная среда на основе ФГМ-С на р-ре Эрла с витаминами без глутамина (0,125% или 0,25%) Производство Покровского завода биопрепаратов Госагропрома СССР г.Покров Владимирской области.	NaCl	6,8	34	68	6,7		
		KCl	0,4	2	4			
		$CaCl_2$ б/в	0,2	I	2			
		$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,I63	0,8I5	I,63			
		$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	I	2			
		Глюкоза	I	5	I0			
		Феноловый красный водный р-р	0,0I	0,05	0,I			
		Пенициллин	I00мг	500мг	I000мг			
		Стрептомицин	I00мг	500мг	I000мг			
		Холинохлорид	0,00I	0,005	0,0I			
		Фолиевая кислота	0,00I	0,005	0,0I			
		Инозит	0,004	0,02	0,04			
		Никотинамид	0,00I	0,005	0,0I			
		-пантотенат кальция	0,00I	0,005	0,0I			
		Витамин B_6	0,00I	0,005	0,0I			
		Витамин B_I	0,00I	0,005	0,0I			
		ФГМ-0,25% или 0,125	2,5 I,25	I2,5 6,25	25 I2,5			

I	2	3	4	5	6	7	8	9
№№ пп	Название питательн. среды	К-во ингредиентов в гр. на объем среды в литрах			pH до стерилизации		Режим стерилизации	Примечание
8.	Кондиционированные среды: Игла ГЛА и среда I99	Использованные после культивирования клеток среды (кондиционированные) сливают в бутыли емк.3-5 л. и хранят в холодильнике при 4°С и добавляют к ним следующие ингредиенты: (срок хранения - 2-е недели) 1. Глюкоза - 1г/л 2. Витамин B_6 - (тиаминбромид) - 0,001 г/л 3. Глютамин - 0,3 г/л 4. $NaHCO_3$ -(7,5%) до pH среды 7,2-7,3			6,5-6,7		Приготовленные среды стерилизуют через пластины СФ, ЕК5-2 или миллипоров. фильтр 0,22мкм	
9.	Питательная среда I99, сухая "Дифко"	Один флакон сухой среды I99, содержащий II0г порошка растворяют в 3 л воды при постоянном помешивании. Доводят раствор до 37°С до полного растворения порошка и доливают деминерализованной воды до I0л, затем pH раствора доводят до 7,2-7,4, добавляя 35 мл I0% раствора бикарбоната или 3,5 г сухого бикарбоната натрия.				7,7-7,4 вый		Стерилизация через пластины СФ, ЕК5-2, или миллипоровый фильтр 0,22 мкм

УII. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, РАСТВОРОВ.

Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве.

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

Соотношение показаний манометра и температуры кипения воды

Показания манометра (атмосферы)	Температура кипения воды в °С
0	I00
0,2	I05
0.4	II0
0,5	II2
0,6	II4
0,7	II6
0,8	II7
0,9	II9
I	I2I
I,5	I27
2	I34

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 °С	Примечание
Бензонафтол	II0	На I00 г порошка-индикатора прибавляется 0,0I г фуксина или метиленовой сини.
Антипирин	II5	
Серный цвет	II5	
Резорцин чистый	II8	
Бензойная кислота	I2I	

Запаяные 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 незавинченной крышке и открытом выпускном кране. Стерилизацию текучим паром следует проводить повторно, так как однократное прогревание при температуре I00°С 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 I00°С, предложенная Тиндалем. Прогревание стерилизуемого материала производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу при температуре 60-65°С в течение 5 дней при 70-80°С в течение 3-х дней. В промежутках между прогреваниями обрабатываемый материал выдерживают при температуре 25-37°С 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

I. Практикум по ветеринарной микробиологии. В.А.Байрак, В.М.Беляев, С.С.Гительсон и др. - М.:Колос. 1980.
2. Готтшлак Г. Метаболизм бактерий. - М.:Мир, 1982.
3. Джавец Э., Мельник Дж.Л., 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., Ингрэм Дж. Мир микробов: в 3 т. М.: Мир, 1979, т.I
10. Телишевская Л.Я., Простяков А.П., Цыганкова С.И., Трусова Л.И. Контроль и стандартизация компонентов и питательных сред бактериальных культур. - Бюллетень ВИЭВ, вып.49. - М.:ВИЭВ, 1983.
11. Методические рекомендации по физико-химическому и биологическому контролю белковых гидролизатов для бактериологических питательных сред (Простяков А.П., Рогожин С.П., Фоменко А.С. и др.) МСХ СССР, ВНИиТИБП, 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 бактерийных 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 исследов. иях. - М.:Медицина, 1962.
17. Голубев Д.Б. с соавт. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. - Л.: Медицина, 1976.

I8.Дьяконов Л.П.,Глухов В.Ф.,Поздняков А.А.Г.Ф.Денисенко и др. Культура клеток и тканей животных.Ставрополь,I980.

I9.Сергеев В.А. Репродукция и выращивание вирусов животных. М.,Колос,I976.

20.Соловьев В.Д.,Бектемиров Г.А. Тканевые культуры в вирусологии. М.:Медицина,I963.

2I.Уосли Дж. Новые методы культуры животных тканей.М.:Мир,I976

gost.e-ecolog.ru