**Лабораторная работа №2 (2 часа)**

**Тема: Приготовление питательных сред**

**Цель работы:** изучить методику приготовления питательных сред, рас- смотреть способы их разливки, а также методы стерилизации питательных сред и лабораторной посуды.

 **Материалы и оборудование:** говяжье мясо, марлевые салфетки, водяная

баня, вата или хлопчатобумажная ткань, поваренная соль, пептон, яйцо, фильтровальная бумага, индикаторная бумага, 10% раствор бикарбоната натрия.

**Теоретическое обоснование работы**

**Рецепты приготовления питательных сред**

 *Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ).*
 На жидкой среде МПБ может развиваться большинство гетеротрофных микроорганизмов. Для приготовления бульона используют говяжье мясо, полностью очищенное от костей, сухожилий и жира. К 1 л водопроводной воды добавляют 500 г мяса, пропущенного через мясорубку, и оставляют настаиваться на холоде в течение суток. Настой процеживают сквозь марлю, отжимают мясо и ставят в холодную водяную баню. Доводят воду в бане до кипения и выдерживают настой в кипящей воде 1/2 ч. Затем настой фильтруют через вату или тряпочку из хлопчатобумажной ткани.
 К бульону добавляют 5 г поваренной соли и 10 г пептона. Затем осаждают растворимые белки, для этого бульон выдерживают в автоклаве при 1 атм в течение 20 мин.
 Для более полного осаждения белков и полной прозрачности бульона перед помещением его в автоклав в бульон вливают взбитый белок одного куриного яйца с равным количеством воды. После осаждения белков бульон фильтруют через бумажный (лучше складчатый) фильтр и проверяют его рН индикаторной бумажкой.
 Обычно бульон имеет слабокислую реакцию и поэтому непригоден для выращивания бактерий, вследствие чего его нейтрализуют до слабощелочной реакции, добавляя 10%-ный раствор бикарбоната натрия. После этого бульон помещают в колбу, закрывают ее ватной пробкой с бумажным колпачком и стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.
 В ряде случаев и после осаждения бульон не получается абсолютно прозрачным. Тогда коллоидные частицы осаждают после нейтрализации повторно, проводя описанные выше процедуры.
 Готовый бульон должен быть абсолютно прозрачным, янтарно-желтого цвета. Приготовление бульона описанным способом — процесс длительный и трудоемкий, который можно значительно упростить, имея в распоряжении бульонные кубики. В этом случае достаточно растворить 2 бульонных кубика в 1 л воды при кипячении. Затем бульон фильтруют через ватный фильтр и стерилизуют указанным способом. В бульон не добавляют поваренной соли, но проверяют рН среды. Опыт показывает, что более концентрированный бульон делать не следует, так как рост культур на нем происходит хуже.
 *Очистка агара.*
 В агаре могут содержаться различные вещества, отрицательно влияющие на рост микроорганизмов. Например, жирные кислоты обладают значительной токсичностью по отношению к ряду бактерий. В связи с этим поступивший в продажу агар перед употреблением очищают промыванием. Для этого сухой агар помещаiот в марлевый пакет, который привязывают к водопроводному крану и под струей воды промывают агар в течение нескольких часов. Если водопроводная вода жесткая, то промывать агар следует дистиллированной водой, которой заливают агар и меняют ее не менее 10 раз в течение двух дней.
Промытый агар раскладывают тонким слоем и сушат при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния.
 *Приготовление мясо-пептонного агара (МПА).*
 МПА представляет собой универсальную плотную среду, которая плавится только при температуре около 100°С и позволяет работать практически в любых температурных условиях. Исходной средой для приготовления МПА является МПБ, приготовленный описанным выше способом. К готовому бульону добавляют 2% агара и нагревают в автоклаве с открытым вентилем и незавинченной крышкой до полного растворения агара. Горячую среду нейтрализуют 10%-ным раствором соды до слабощелочной реакции.
Коллоидные частицы осаждают способом, указанным при приготовлении МПБ, фильтруют через складчатый фильтр в горячем виде прямо в открытом автоклаве (агар затвердевает при температуре около 40 °С). Профильтрованный МПА стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин в колбе с ватной пробкой в бумажным колпачком.
П р и м е ч а н и е. Фильтрование МПА — длительная процедура, требующая поддержания высокой температуры фильтруемой среды.

 *Приготовление мясо-пептонной желатины (МПЖ)*
 МПЖ — твердая питательная среда — плавится при температуре около 25°С и поэтому непригодна для выращивания ряда микроорганизмов, развивающихся при более высокой температуре. Однако использование этой среды необходимо при работе с определением вида бактерий для выявления протеолитических ферментов.
 Исходной средой для приготовления МПЖ также является мясо-пептонный бульон, в который добавляют 14—16% мелко нарезанной желатины. Температура застывания среды 24—26°С. Желатину растворяют в бульоне при температуре не выше 100°С среду нейтрализуют до слабощелочной реакции и проводят осаждение с применением белка куриного яйца в автоклаве с открытым вентилем при температуре 100°С. После этого среду фильтруют в колбу, в которой ее хранят, или разливают по пробиркам и стерилизуют методом тиндализации. Нагревание сред с желатиной выше 100°С не допускается, так как в этом случае желатина меняет свойства и не застывает при охлаждении.

 *Приготовление голодного агара.*

 В автоклаве с открытым вентилем растворяют агар в водопроводной воде. Агара берут 2% по отношению к объему воды. После полного растворения агар осветляют белком и фильтуют в горячем виде. Среду стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

 *Приготовление бобового агара.*
 В 1 л воды кипятят 100 г белой фасоли или белых бобов. Кипячение ведут осторожно, избегая растрескивания бобов и превращения крахмала в клейстер. Полученный отвар фильтруют в горячем виде. (Его можно использовать как жидкую питательную среду.)
 К бобовому отвару добавляют 2% агара. Агар расплавляют в автоклаве, осаждают коллоидные частицы, фильтруют и стерилизуют, как при приготовлении других агаровых сред.

 *Приготовление картофельной среды.*
 Картофельные среды, содержащие необходимые питательные вещества, широко используются для выращивания гетеротрофных микроорганизмов.
Для приготовления среды выбирают хорошие, неповрежденные клубни картофеля, из которых вырезают плоские ломтики в том случае, если выращивание будет проводиться в чашках Петри. Если выращивание предполагается в пробирках, то из клубня пробочным сверлом вырезают цилиндрические куски, которые рассекают потом на два клина. Клин помещают в пробирку так, чтобы косая поверхность была обращена кверху.
 Для нейтрализации кислой среды клеточного сока поверхность кусочков картофеля натирают мелом, затем помещают в чашки Петри (или пробирки). Дно чашки Петри выстилают фильтровальной бумагой, а на дно пробирки кладут кусочек ваты для впитывания воды, образущейся при варке.
Если среда рассчитана на длительное хранение в пробирках, то под вату наливают немного воды, так как при хранении картофель подсыхает. Стерилизуют среду при 1 атм в течение 30 мин.
П р и м е ч а н и я. 1. Со стерилизацией нельзя медлить, так как картофель быстро темнеет и будет непригоден для работы. Нагревание разрушает ферменты, и потемнения не происходит.
2. Режим стерилизации следует строго выдерживать. При недостаточной стерилизации стойкие споры бактерий, находящиеся постоянно в картофеле, сохранятся и дадут рост.

 *Приготовление пивного сусла и сусло-агара.*
 Неохмеленное пивное сусло, полученное с пивоваренного завода, разбавляют водой до 6-7° по Балингу и используют для культивирования многих микроорганизмов.
 Для получения плотной среды сусло-агара (СА) к пивному суслу добавляют 2% агара. Среду разваривают в автоклаве с открытым вентилем. Сусло-агар является прекрасной средой для молочнокислых бактерий и дрожжей. При отсутствии готового сусла пользуются солодовой средой, которую готовят следующим способом.
 Зерновки ячменя проращивают до наклевывания, затем высушивают их при температуре 60—70 °С и мелют на кофейной мельнице.
 Нагревают 1 л воды до 50°С и, перемешивая, всыпают в нее 250 г молотого солода. Оставляют в воде без нагревания на 30 мин, затем воду нагревают и поддерживают температуру 55-58˚С. Время от времени из жидкости берут пробы на крахмал (иодная проба). Когда водная проба покажет полное осахаривание крахмала, сусло фильтруют и затем стерилизуют при 1/2 атм. в течение 30 мин (так же стерилизуют готовое сусло).
 Следует иметь в виду, что для культивирования дрожжей используют сусло с содержанием сахара 6—8%, а для молочнокислых бактерий - 8—12%, поэтому в используемом сусле нужно определять содержание сахара.

 *Приготовление молока как питательной среды*
 Молоко содержит все питательные вещества, необходимые гетеротрофным микроорганизмам. Для приготовления среды используют снятое молоко, которое разливают в пробирки примерно по 10 мл, затем закрывают их ватными пробками и стерилизуют методом тиндализации (см. дальше).
 Стерилизация молока при более высокой температуре приводит к карамелизации молочного сахара. Внешне это выражается в изменении цвета молока (топленое молоко). Для определения образования микроорганизмами кислоты в молоко перед стерилизацией можно добавить небольшое количество 5%-ной настойки лакмуса. Тогда образование кислоты будет определяться не только свертыванием молока, но и покраснением среды.

 *Разливка питательных сред*
 Питательные среды обычно готовят впрок в колбах большого объема. Перед работой среды разливают в пробирки или чашки Петри в зависимости от назначения. Твердые питательные среды перед разливкой расплавляют. Агар удобнее расплавлять в автоклаве с открытым вентилем или на водяной бане. Желатина легко плавится при нагревании на водяной бане до 25—30°С. После расплавления среды разливают в посуду необходимого объема, соблюдая стерильность. Для этого горло колбы во время разлива проводят через пламя спиртовки, ватную пробку после разлива обжигают. Во время работы пробку держат между мизинцем и безымянным пальцем правой руки.
После разлива пробирки со средами (в зависимости от хранения среды) стерилизуют одним из способов, указанным ниже. Для получения прямого агара или желатины пробирки ставят в штатив, а для получения скошенных поверхностей сред их кладут наклонно на подставку, но так, чтобы столбик среды внизу пробирки был не менее 1 см, а верхний конец косяка заканчивался за 3—4 см до пробки (рис. 2).

Рис. 2. Пробирки с косым агаром. Укладка пробирок для получения косого агара.



**Методы стерилизации питательных сред и посуды**

 Основываясь на влиянии внешних условий на микроорганизмы, в микробиологической практике разработан ряд приемов, приводящих микроорганизмы к гибели. Одним из таких приемов является стерилизация. Под стерилизацией (обеспложиванием) понимают полное уничтожение микроорганизмов и их спор в питательных средах, посуде, на инструментах и других предметах лабораторного оборудования. Для их стерильности наиболее часто пользуются воздействием высокой температуры.
 *Стерилизация обжиганием на пламени горелки*
 Небольшие стеклянные (палочки, шпатель) и металлические предметы (игла, петля, пинцет, скальпель) проводят несколько раз через пламя горелки. Стерилизация достигается обугливанием находящихся на их поверхности микроорганизмов. Обжиганием на пламени пользуются для стерилизации поверхности ватных пробок, горла посуды.
 *Стерилизация кипячением*
Стерилизацию металлических инструментов и резиновых трубок проводят кипячением. Так как споры некоторых бактерий сохраняют жизнеспособность при кипячении в воде в течение нескольких часов, то рекомендуется стерилизацию кипячением проводить в 2%-ном растворе карбоната натрия в течение 10 мин. В этих условиях споры погибают.
 *Стерилизация сухим жаром*
 Сухим жаром стерилизуют в основном стеклянную посуду. При этом пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, их перед стерилизацией заворачивают в оберточную бумагу и вынимают из, нее только перед работой.
 Пипетки заворачивают полоской бумаги шириной 2,5—3,0 см. Предварительно в конец пипетки, который берут в рот, вкладывают ватный тампон. Капиллярный конец пипетки кладут на полоску бумаги под углом 45° и заворачивают по спирали.
 Чашки Петри заворачивают в бумагу в форме квадрата. Чашку Петри помещают на середину листа, загибают его с двух противоположных сторон кверху, края дважды загибают швом. Два свободных конца загибают вниз. При таком обертывании у чашек легко различать верх и низ. Подготовленную таким образом посуду помещают в сушильный шкаф, в котором нагревают ее при температуре 160—170°С в течение 2 ч. При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры. Температуру в сушильном шкафу выше 175°С допускать не следует, так как при этом ватные пробки буреют, а бумажная обертка становится ломкой.

 *Стерилизация текучим паром.*
 Дробная стерилизация, или тиндализация
 Питательные среды (молоко, солод, желатина), воду, резиновые трубки и другие предметы, портящиеся от действия сухого жара, подвергают стерилизации текучим паром. Стерилизацию текучим паром производят в кипятильнике Коха или в автоклаве с открытым вентилем. Воду в них доводят до кипения, и образующийся пар обтекает стерилизуемые объекты. Температура стерилизуемых питательных сред достигает 100°С. Нагревание в течение 30—45 мин приводит к гибели вегетативных клеток бактерий, но споры их не погибают. На следующий день нагревание повторяют. При этом погибают вегетативные клетки, развившиеся из спор, для обеспечения полной стерильности жидкость оставляют еще на сутки и снова повторяют нагревание. Такую стерилизацию называют дробной, или тиндализацией.
 *Пастеризация.*
 В основе пастеризации лежит нагревание жидкостей до температуры меньше 100°С. Цель ее - уничтожение неспороносных бактерий в жидкостях, теряющих питательные свойства при кипячении (молоко, пиво, вино и др.). Осуществляется пастеризация нагреванием жидкостей при 60°С в течение 30 мин, или при 75°С в течение 15 мин, или при 80°С в течение 10 мин.
 *Холодная стерилизация*
 Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождают от бактерий, пропуская через стерильные мелкопористые фильтры. Эти фильтры задерживают микроорганизмы, их называют бактериальными фильтрами.
 Бактериальные фильтры имеют разные номера. Фильтры №1имеют средний диаметр пор 0,3 мкм, они наиболее надежны. Фильтры №5 имеют самые большие отверстия пор, диаметром 1,2 мкм.
 Перед употреблением мембранные фильтры стерилизуют кипячением. Фильтры помещают в теплую дистиллированную воду и кипятят 30 мин, меняя ее 2—3 раза.
 *Стерилизация в автоклаве паром под давлением.*
 Наиболее надежный и универсальный метод стерилизации питательных сред и материалов - стерилизация их насыщенным паром под давлением. Производят ее в автоклаве, в котором стерилизуемые объекты нагревают чистым насыщенным паром при давлении выше атмосферного. Когда насыщенный пар встречается с более холодным объектом, он конденсируется, превращаясь в воду. При конденсации выделяется большое количество теплоты, температура стерилизуемого объекта быстро повышается.

Полная стерилизация питательных сред при 120°С и давлении 1 атм. обеспечивается нагреванием в течение 20 мин.

 **Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Изучить состав и приготовление различных питательных сред.

2. Приготовить по указанным рецептам 2-3 питательные среды, придерживаясь приведенной методики.

3. Сделать розлив питательных сред и провести их стерилизацию, применив автоклав.

Контрольные вопросы:

1.  Расшифруйте следующие понятия: МПБ, МПА, МПЖ, СА.

2.  Что представляет из себя скошенный агар?

3.  Что называют стерилизацией?

4.  Какие методы стерилизации питательных сред и лабораторной посуды вы знаете?

Посмотреть видео по ссылке.

<https://www.youtube.com/watch?v=t9Mb3MVt2pI>