

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПР


А.Ю. Дмитриев
«29» июня 2015 г.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические указания к выполнению лабораторной работы
по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология»
и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

Составитель А.П. Асташкина

Издательство
Томского политехнического университета
2015

УДК 541.18(076.5)

ББК 24.6я73

П75

**Приготовление питательных сред и культивирование
П75 микроорганизмов** : методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина ; Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.

УДК 541.18(076.5)

ББК 24.6я73

Методические указания рассмотрены и рекомендованы
к изданию методическим семинаром кафедры
физической и аналитической химии ИПР
«29» июня 2015 г.

Зав. кафедрой ФАХ
доктор химических наук,
профессор


_____ А.А. Бакибаев

Председатель
учебно-методической комиссии


_____ Н.В. Ушева

Рецензент

Кандидат химических наук,
доцент кафедры ФАХ ИПР ТПУ
Е.В. Михеева

© Составление. ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2015

© Асташкина А.П., составление, 2015

© Оформление. Издательство Томского
политехнического университета, 2015

План коллоквиума

по теме «Питание микроорганизмов и закономерности микробного роста»

1. Питание микроорганизмов. Классификация бактерий по типам
2. Закономерности роста популяций микроорганизмов. Удельное время роста. Время генерации. Культивирование. Виды культивирования.
3. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях. Питательные среды. Классификация питательных сред. Приготовление питательных сред. Стерилизация.
4. Культивирование аэробных микроорганизмов.

Список литературы

1. Калганова Т.Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии : лабораторные работы / Т.Н. Калганова. – Южно-Сахалинск : СахГУ, 2011. – 56 с.
2. Нетрусов А.И. Общая микробиология : учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – Москва : Академия, 2007. – 220 с.
3. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы : учеб. пособие. – Санкт-Петербург : изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 147 с.
4. Асонов Н.Р. Микробиология / Н.Р. Асонов. – Москва : ВО Агропромиздат, 1989. – 230 с.
5. Аникеев В.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – Москва : Просвещение, 1983. – 128 с.

Теоретическая часть

Культивирование микроорганизмов является одним из основных методов микробиологии. От умения культивировать микроорганизмы в лабораторных условиях в значительной степени зависят успехи их изучения и практического применения. Культивирование основано на знании метаболизма микроорганизмов и понимании значения физико-химических условий среды, необходимых для их жизнедеятельности.

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты – питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют «средами для культивирования».

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микроорганизмов.

1. Требования, предъявляемые к средам

Среды должны соответствовать следующим условиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства среды (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среду вносят факторы роста – витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов – рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества. Для большинства бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2–7,4). Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью (содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена);

3) быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других – низкий. Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы – при RH_2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

Желательно, чтобы среды были прозрачными – удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

2. Классификация питательных сред

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования (выделение, выращивание, длительное сохранение микроорганизмов в культурах).

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки:

1. Исходные компоненты

По исходным компонентам различают натуральные, полусинтетические, синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и др.), поэтому точный состав этих сред неизвестен. Их используют в том случае, когда хотят вырастить различные виды микроорганизмов.

Чаще всего обычно используют полусинтетические среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непищевыми: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, сгустками крови и др. Примером таких сред могут быть мясопептонные среды, в которые, кроме мясного экстракта и пептона, входят: поваренная соль, фосфат

калия. Полусинтетические среды хороши для выращивания определенных групп микроорганизмов, а также для выделения из среды продуктов их жизнедеятельности: антибиотиков, витаминов.

Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в бидистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

2. Консистенция (степень плотности)

Среды бывают жидкие, плотные и полужидкие. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких веществ, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар – это полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80–100°C, застывает при 40–45°C.

Желатин – белок животного происхождения. При 25–30°C желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при рН ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество – при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем, каррагинан.

3. Состав

Среды делят на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. Назначение

а) **основные** (общеупотребительные) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов. Например, МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода;

б) **специальные** среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах. Например, для культиви-

рования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмококков – сыворотку крови;

в) **элективные** (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится элективными при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН. Например, среда Эшби является селективной для рода *Azotobacter*, в среде Виноградского развиваются только нитрифицирующие бактерии.

Жидкие элективные среды называют средами накопления. Примером такой среды служит пептонная вода с рН 8,0. При таком рН на ней активно размножается холерный вибрион, а другие микроорганизмы не растут;

г) **дифференциально-диагностические** среды позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности, например среды Гисса с углеводами и индикатором. При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды. Например, бактерии рода на агаризованной среде Эндо образуют малиновые колонии с металлическим блеском – для рода *Escherichia*;

д) **консервирующие** среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание микроорганизмов и подавляется развитие других микроорганизмов.

3. Этапы приготовления питательной среды

1. **Взвешивание:** отбирают навески компонентов питательной среды на аналитических весах;

2. **Растворение:** компоненты питательной среды растворяют в предварительно нагретой до 70 °С дистиллированной воде. Растворы макро- и микросолей готовят отдельно. Растворы фосфатов входящих в состав макросолей также готовят отдельно, т. к. в процессе стерилизации в автоклаве они выпадают в осадок и в дальнейшем вновь требуют растворения.

3. **Кипячение:** растворы питательных сред кипятят на водяной бане в течении 2 мин.

4. **Установление рН:** ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром. При стерилизации рН снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.

5. **Фильтрация** жидких и расплавленных плотных сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена – они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

6. **Розлив** сред: питательные среды разливают не более чем на 3/4 емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

7. **Стерилизация:** для стерилизации питательный сред используют термический способ: стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте. При автоклавировании 3–5 % жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5 % дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда будет иметь требуемую концентрацию.

8. **Контроль:**

- для контроля *стерильности* среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.
- *химический* контроль окончательно устанавливает рН, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.
- для *биологического* контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды.

4. Методы стерилизации посуды и питательных сред

Стерилизация – важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает «обеспложивание». В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Стерилизуют посуду, инструменты, питательные среды и другие необходимые предметы с целью не допустить развитие посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Основные способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов представлены в таблице.

Таблица 2

Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

| Стерилизуемый материал | Метод стерилизации | Режим стерилизации | Примечание |
|---|--------------------|------------------------|--|
| Натуральные питательные среды (почвенная вытяжка, картофельные и др.) натуральные среды | Автоклавирование | 1,5–2,0 ати; 30 мин | В колбах, пробирках, бутылках и т. д., закрытых пробками |

| Стерилизуемый материал | Метод стерилизации | Режим стерилизации | Примечание |
|---|--|--------------------|---|
| Жидкие и агаризованные среды, не содержащие сахаров и других веществ, разлагающихся при 120 °С | То же | 1,0 ати; 20 мин | То же |
| Жидкие и агаризованные среды с сахарами и другими соединениями, не выдерживающими нагревания при 120 °С | То же | 0,5 ати; 15–30 мин | То же |
| Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревание (белки, некоторые витамины и аминокислоты) | Фильтрация через бактериальные фильтры | – | – |
| Чашки Петри, пипетки, шпатели | То же | 160–170 °С; 2 ч | Завернуты в бумагу (отверстия пипеток закрыты ватными пробками) |
| Колбы, пробирки, химические стаканы, флаконы, стеклянные центрифужные пробирки | То же | 160–170 °С; 2 ч | Закрываются ватными пробками |
| Шприцы | Горячий воздух | 160 °С; 1 ч | Разобраны и завернуты в бумагу |
| | Автоклавирование | 1,0 ати; 15–20 мин | Разобраны и завернуты в бумагу |

*ати – атмосферное давление избыточное

Существует *термическая* и *холодная* стерилизация.

Термическая стерилизация осуществляется прокаливанием в пламени и обжигание, горячим воздухом (сухожаровая стерилизация), насыщенным под давлением паром (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячением и др.

1. **Прокаливание** на огне: в пламени горелки или спиртовки обычно стерилизуют петли и иглы для посева, предметные стекла, инструмент.

2. **Кипячение** – в течение 30 мин: обычно кипятят шприцы, иглы, пищевые продукты и др. При этом могут сохраняться споры бактерий.

3. **Стерилизация сухим жаром (сухожаровая)** – в специальном сушильном шкафу, как правило, стерилизуют хорошо вымытую посуду: колбы, пробирки и др.; обычно каждый предмет завертывают в пергаментную бумагу. При температуре 160–170 °С погибают не только все микроорганизмы, но и их споры.

4. **Стерилизация паром** проводится при температуре 100–120 °С, так как во влажной атмосфере микроорганизмы погибают быстрее при более низкой температуре.

Существует два способа стерилизации паром:

а) ***стерилизация насыщенным паром под давлением***

Данный способ стерилизации питательных сред является наиболее надежным и чаще всего приемлемым. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает особую эффективность этого процесса (табл. 2).

Таблица 3

Температура насыщенного пара при разных давлениях

| Давление | Температура, °С | | | | |
|----------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| | 100 | 111 | 121 | 128 | 134 |
| ати | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| атм | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 |

Обычно автоклавирование осуществляется при температуре 121 °С (1 атм) в течении 15–30 мин, при этом погибают и вегетативные клетки споры микроорганизмов). Этот способ не приемлем для тех сред, которые содержат в своем составе белки или другие вещества, разрушающиеся при высокой температуре;

б) ***стерилизация текучим паром (тиндализация)***

Тиндализация, стерилизация текучим паром применяется для сред, портящихся при действии температур выше 100 °С. Тиндализацию осуществляют текучим паром в автоклаве с завинченной крышкой или в кипятильнике Коха. Среды нагревают несколько раз по 10–15 мин. Между прогреванием среды ставят в термостат при температуре 30 °С на 8–12 ч для прорастания жизнеспособных спор. Среды, не выдерживающие нагревание при 100 °С, прогревают более осторожно: при 60–80 °С через каждые 8–12 ч 4–5 суток подряд.

5) **Пастеризация** – метод, применяемый для уничтожения неспороносных бактерий в питательных средах (вине, молоке, соке, пиве и др.), теряющих свои качества при кипячении. Пастеризуют среды в течение 15–30 мин. при температуре 50–60 °С или в течение 5–10 мин. при температуре 70–80 °С в водяной бане или термостатах.

Холодная стерилизация проводится путем фильтрования или облучения УФ-лучами тех сред, которые не выдерживают нагревания, содержащие белки, витамины, антибиотики:

а) **стерилизация фильтрованием** – применяется для жидкостей, не выдерживающих нагревания. Для этого используют мелкопористые фильтры, в последнее время распространены мембранные (задерживающие бактерии и их споры и даже вирусов и бактериофагов). Перед фильтрованием фильтры стерилизуют кипячением. Само фильтрование ведется под вакуумом;

б) **стерилизация УФ-лучами** ведется с применением кварцевых ламп, которые пропускают УФ-лучи. Питательные среды и другие предметы помещают на расстоянии 20–30 см от источника света на 20 мин. При этом воздействии погибают микроорганизмы, но остаются живыми их споры. Конкретно стерилизация различных сред описана в специальных источниках, справочниках.

5. Условия культивирования микроорганизмов

Для роста микроорганизмов существенное значение имеют следующие факторы: кислотность среды, аэрация, температура, свет, влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь при определенных пределах каждого фактора, причем при различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы.

1. Кислотность среды

Кислотность (рН) среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше растет при рН, близким к 7,0. Значение рН сред может измениться в процессе стерилизации, его следует проверить, и, в случае необходимости, довести до нужного с помощью стерильных растворов кислот (HCl, H₂SO₄), щелочи (NaOH, KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (Na₂CO₃, NaHCO₃). Кислотность питательной среды, благоприятная для начала роста микроорганизмов, часто меняется в процессе их культивирования. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных компонентов среды. Измеряют рН электрометрическим методом на потенциометре. В лабораторной практике удобно использовать различные жидкие или бумажные индикаторы.

2. Аэрация

Кислород входит в состав воды и многих соединений, поэтому поступление в клетки в больших количествах. Значительная часть микроорганизмов нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода (*облигатные аэробы*), для которых молекулярный кислород играет роль терминального окислителя. Развитие других микроорганизмов напротив, возможно только в отсутствие кислорода (*облигатные анаэробы*). Получение энергии у них не связано с использованием молекулярного кислорода, а для многих кислород даже токсичен. *Факультативные анаэробы* способны расти как в присутствии, так и в отсутствии молекулярного кислорода. Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде учитываются при выборе способа их выращивания.

3. Температура

В зависимости от температурных параметров выделяют три группы микроорганизмов – термофилы, психрофилы и мезофилы.

Для термофилов (теплолюбивых) зона роста от 45 °С до 80–90 °С, Термофилы не способны размножаться в организме теплокровных животных, поэтому медицинского значения не имеют.

Психрофилы (холодолобивые) хорошо развиваются в интервале температур 5–15 °С. Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры. Размножаясь в пищевых продуктах при температуре бытового холодильника, эти бактерии более вирулентны при низких температурах.

К мезофилам относится большинство известных форм микроорганизмов, Температурный оптимум лежит в интервале от 25 до 37 °С.

Таблица 4

Дифференциация микроорганизмов по температурному режиму

| Микроорганизмы | Температурные границы размножения, °С | Место существования |
|----------------|---------------------------------------|---|
| Психрофильные | 0–20 | Водоемы холодных морей и океанов, почва полярных регионов и зон вечной мерзлоты |
| Мезофильные | 20–45 | Организм животных и человека |
| Термофильные | 45–70 | Верхние слои почвы, горячие источники, навоз, торф, отходы хлопкабавовни |

Температурные зоны гибели микроорганизмов широко варьируются. Вегетативные формы погибают при температуре 60–80°C в течение часа, при 100°C – мгновенно. Споры и цисты устойчивы к температуре 100 °С, гибнут при 130°C и более длительной экспозиции (до 2 ч). Нижняя температурная граница гибели микроорганизмов варьирует от 20°C (возбудители кори, коклюша, сифилиса, менингококковой и гонококковой инфекции) до абсолютного нуля. Повреждающее действие высокой температуры связано с необратимой денатурацией ферментов микроорганизмов, низкой – с разрывом клеточной мембраны кристаллами льда и приостановкой метаболических процессов.

4. Свет

Для роста подавляющего большинства микроорганизмов освещение не требуется. Напротив, солнечные лучи отрицательно влияют на их развитие, поэтому такие микроорганизмы выращивают в темноте. Выбор источника освещения определяется спектром его излучения или длинами волн, при которых культивируемые микроорганизмы осуществляют фотосинтез (*фототрофные микроорганизмы*).

5. Вода

Рост микроорганизмов невозможен без присутствия в окружающей среде воды, причем вода должна находиться в доступной для клетки форме, то есть жидкой фазе. Доступность воды в субстрате для роста микроорганизмов выражают величиной активности воды (a_w): $a_w = P/P_0$, где P – давление пара над раствором, мм рт. ст.; P_0 – давление пара над чистой водой при данной температуре.

6. Культивирование микроорганизмов

Аэробные микроорганизмы можно культивировать (выращивать) на поверхности жидких и плотных сред – *поверхностное культивирование* или внутри жидкой питательной среды – *глубинное культивирование*. При поверхностном культивировании кислород поступает в клетки микроорганизмов непосредственно из воздуха, поэтому важно увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном – чашки Петри, колбы Виноградского, матрасы. Посев на плотные питательные среды используют для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры. В случае если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения. Для увеличения поверхности соприкосновения питательной

среды с кислородом воздуха в глубинном культивировании используют качалки (шейкеры), обеспечивающие встряхивание или вращение колб, пробирок. Чем больше частота вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом.

Существуют два режима культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде: периодическое и непрерывное (проточное). В случае периодического культивирования после инокуляции среды в нее не добавляют и из нее не удаляют какие-либо компоненты, кроме газовой фазы

Посев – один из стационарных методов культивирования микроорганизмов на питательных средах, применяемый для культурально-морфологической диагностики в медицинской микробиологии, а также для исследования биохимических и биологических свойств в различных биотехнологических целях. В зависимости от содержания исследуемых бактерий в образце, проводят посев на плотные питательные среды (для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры). Если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения.

Экспериментальная часть

Цель: приготовить питательную среду для культивирования микроорганизмов микрофлоры воздуха, воды.

План работы:

1. Познакомиться с основными средами для культивирования микроорганизмов, методами стерилизации посуды.
2. Приготовить питательную среду из готового полусинтетического порошка МПА.
3. Посеять микрофлору воздуха в различных вариантах опыта.
4. Посеять микрофлору воды в различных вариантах опыта.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, маркер по стеклу, аналитические весы, плитка, дистиллированная вода, стеклянные палочки, сушильный шкаф, термостат, химический стакан, полусинтетический МПА.

1. Приготовление питательной среды (МПА) для исследования микрофлоры воды, воздуха

Питательная среда мясо-пептонный агар (МПА) состоит из мясного экстракта, пептона, хлорида натрия, дигидрофосфата натрия и агар-агара.

Вариант № 1

Навеску сухого полусинтетического МПА, массой 1,5 г, помещают в химический стакан, объемом 100 см³, и растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Химический стакан помещают на электрическую плитку и доводят среду до кипения, постоянно перемешивая стеклянной палочкой. Питательную среду, не охлаждая, осторожно через воронку разливают в четыре пробирки. При этом среда не должна попадать на верхнюю часть пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, оборачивают пергаментом и стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 15 мин.

Вариант № 2

Навески пептона мясного ферментативного 0,5 г и агар-агар микробиологического 0,75 г помещают в химический стакан, объемом 100 см³, и растворяют в 50 см³ дистиллированной воды. Химический стакан помещают на электрическую плитку и доводят среду до кипения, постоянно перемешивая стеклянной палочкой. Питательную среду, не охлаждая, осторожно через воронку разливают в четыре пробирки. При

этом среда не должна попадать на верхнюю часть пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, оборачивают пергаментом и стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 15 мин.

После автоклавирования, пробирки с расплавленной питательной средой МПА (50–55 °С) переносят в ламинарный бокс и разливают в стерильные чашки Петри.

Заполненные чашки Петри с питательной средой МПА остужают, вращая чашку по столу. Затем чашку этикетируют (на крышке маркером указывают дату, название питательной среды, фамилию исследователя) и перевернутыми помещают в инкубатор-термостат. Инкубацию проводят в термостате при 37 °С в течение 48 часов. После выдерживания чашек их можно использовать для культивирования микроорганизмов воды, почвы, воздуха.

Посев микрофлоры воздуха

В окружающей нас среде, в атмосфере содержатся как сапрофитные микроорганизмы почвы, попадающие из земли, так и микроорганизмы, обитающие на слизистых оболочках дыхательных путей человека в закрытых помещениях. Могут встречаться и патогенные формы, которые способны высеяться в воздухе в закрытых помещениях.

Посев производится следующим образом: в изучаемом помещении чашки Петри (2 шт) с питательной средой МПА размещают на горизонтальную поверхность вдали от сквозняков, открывают крышку и оставляют на 5 минут. Через 5 мин чашки закрывают и на крышке маркером указывают дату и место отбора. Чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсирующаяся влага не смачивала посевы. Инкубацию проводят в термостате при 25–28 °С в течении недели. Через два-три дня на поверхности наблюдают развитие колоний микроорганизмов. Их подсчет и анализ производят на шестой-седьмой день после посева.

Посев микрофлоры воды

Для знакомства с микрофлорой воды используют пробу воды из водоема (лучше из закрытого водоема) и дают отстояться при комнатной температуре в течении 5 минут.

Вариант № 1

Отбирают 1 см³ исследуемой воды с помощью шприца на 1 см³ и помещают во флакон со стерильной водопроводной водой (9 см³), таким образом, получают первое разведение (10⁻¹). Полученное разведение тщательно перемешивают, несколько раз вбирая новым шприцем и выпуская из него полученную суспензию клеток. Затем этим же шприцем

отбирают 1 см^3 суспензии из разведения 10^{-1} и переносят во второй флакон со стерильной водой, получая второе разведение (10^{-2}). Таким же образом готовят последующие разведения до 10^{-6} (согласно схеме 1), каждый раз используя новый флакон со стерильной водой (9 см^3) и одноразовый шприц. Все разведения проводятся в ламинарном боксе с соблюдением правил техники безопасности.

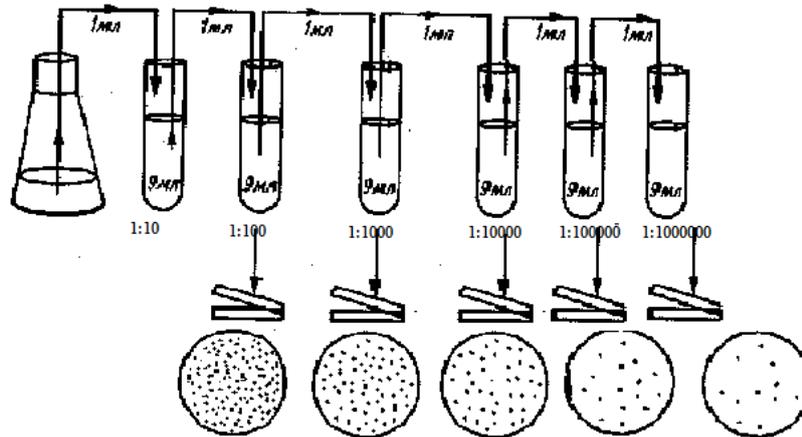


Схема 1. Разбавление суспензии воды

После тщательного взбалтывания содержимого флаконов, из каждого берут с помощью шприца суспензию объемом $0,1 \text{ см}^3$ из разведений 10^{-2} – 10^{-6} и выливают в отдельные чашки Петри теплый ($70 \text{ }^\circ\text{C}$) мясо-пептонный агар. Чашки этикетировывают: на крышке маркером указывают дату и степень разбавления, фамилию исследователя и перевернутыми помещают в инкубатор-термостат (температура 23 – $25 \text{ }^\circ\text{C}$) на неделю. Подсчет колоний проводят, не открывая чашек Петри.

Вариант № 2

Отбирают 1 см^3 исследуемой воды с помощью шприца на 1 см^3 и помещают во флакон с мясопептонным бульоном (МПБ) (9 см^3), таким образом, получают первое разведение (10^{-1}). Полученное разведение тщательно перемешивают, несколько раз вбирая новым шприцем и выпуская из него полученную суспензию клеток. Затем этим же шприцем отбирают 1 см^3 суспензии из разведения 10^{-1} и переносят во второй флакон со стерильной водой, получая второе разведение (10^{-2}).

Таким же образом готовят последующие разведения до 10^{-6} (согласно схеме 2), каждый раз используя новый флакон со стерильной водой (9 см^3) и одноразовый шприц. Все разведения проводятся в ламинарном боксе с соблюдением правил техники безопасности. Флаконы этикетировывают: на крышке маркером указывают степень разбавления

(1, 2, 3, 4, 5, 6 и, соответственно, 1', 2', 3', 4', 5', 6'), дату и помещают в инкубатор-термостат (температура 23–25°C) 3–5 дней.

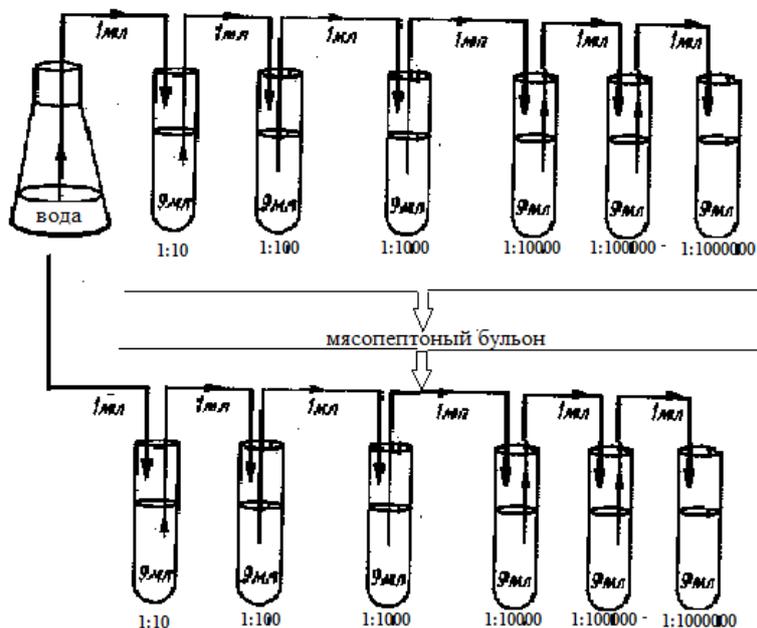


Схема 2. Разбавление суспензии воды

В отчете работы приложить схему разбавления суспензии воды, расчеты количества микроорганизмов в 1 см³ воды

7. Требования к оформлению отчета

Отчет по лабораторной работе должен включать в себя:

- 1) Титульный лист;
- 2) Цели выполнения лабораторной работы;
- 3) Основную часть (краткая характеристика объекта исследований; методика, результаты наблюдений и расчетов, представленные в форме таблиц, рисунков).

- 4) Обсуждение результатов выполнения лабораторной работы в виде кратких обоснований, разъяснений, анализов, оценок, обобщений и выводов.

Учебное издание

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические указания к выполнению лабораторной работы
по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология»
и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

Составитель
АСТАШКИНА Анна Павловна

Издано в авторской редакции

Компьютерная верстка *Д.В. Сотникова*

Подписано к печати 12.10.2015. Формат 60x84/16. Бумага «Снегурочка».
Печать XEROX. Усл. печ. л. 1,11. Уч.-изд. л. 1,00.
Заказ 406-15. Тираж 100 экз.



Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Система менеджмента качества
Издательства Томского политехнического университета
Сертифицирована в соответствии с требованиями ISO 9001:2008



ИЗДАТЕЛЬСТВО  **ТПУ**. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30
Тел./факс: 8(3822)56-35-35, www.tpu.ru