



ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
УПРАВЛЕНИЕ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ И ПОВЫШЕНИЯ  
КВАЛИФИКАЦИИ

Кафедра «Производственная безопасность»

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ** к выполнению лабораторной работы

# **«Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов»**

Составитель  
Киреева В.В.

Ростов-на-Дону, 2013



## Аннотация

Методические указания разработаны в соответствии с учебными программами дисциплин «Физиология человека», «Биология с основами экологии», «Биотехнология» для бакалавров 1, 3 курсов направлений 280700, 110800, 080507 всех форм обучения.

Содержат изложение способов приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов при изучении микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

## Составитель



Киреева В.В., д. биол. н., профессор





## Оглавление

<b>1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ .....</b>	<b>4</b>
<b>2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.....</b>	<b>4</b>
<b>3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ.....</b>	<b>7</b>
<b>4. ЗАДАНИЕ .....</b>	<b>8</b>
<b>5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ.....</b>	<b>8</b>
<b>6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ....</b>	<b>9</b>
<b>7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ....</b>	<b>9</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>10</b>



## 1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Освоить принципы приготовления жидких и твердых питательных сред; овладеть способами стерилизации питательных сред.

## 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Обеспечение оптимальных условий для жизнедеятельности культур микроорганизмов достигается их выращиванием на специальных питательных средах. Питательные среды используют для накопления, выделения, культивирования и хранения микроорганизмов.

Питательная среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки - источники углерода, азота, фосфора, макро- и микроэлементы.

Питательные среды классифицируются по своему составу, назначению и физическому состоянию.

По составу среды делят на следующие группы:

1) естественные (натуральные), состоящие из продуктов растительного или животного происхождения (овощные и фруктовые соки, экстракты, бульоны, молоко и др.). В лабораторной практике широко применяется мясо-пептонный бульон (МПБ), неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды и т.п. Натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы. Нехмеленное пивное сусло является хорошей питательной средой для дрожжей, плесневых грибов и других микроорганизмов. Оно представляет собой раствор, богатый питатель-



## Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

ными веществами – аминокислотами, нуклеиновыми кислотами, витаминами (группы В), органическими кислотами, минеральными солями, углеводами. Содержание сахара в сусле определяют ареометром Баллинга, градусы ( $^{\circ}\text{Б}$ ) которого соответствуют процентному содержанию сахара в сусле. До нужной крепости (по сахарам) сусло разводят водопроводной водой. Для плесневых грибов используют  $3\text{-}4^{\circ}$  сусло, для дрожжей –  $6\text{-}8^{\circ}$ , для молочнокислых бактерий –  $3\text{-}4^{\circ}\text{Б}$ ;

2) синтетические среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые вещества, взятые в точно указанных концентрациях. Они наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов и по своим качествам не уступают натуральным. Для выращивания актиномицетов и бактерий можно использовать среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; агар-агар – 20,0;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{pH}$  среды – 7,0-7,3. Так как в процессе стерилизации  $\text{pH}$  среды часто меняется, то его корректируют добавлением  $\text{HCl}$  или  $\text{NaOH}$ .

По назначению питательные среды разделяют на селективные и дифференциально-диагностические (индикаторные).

Селективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы и менее пригодны (или совсем не пригодны) для развития других. Эти среды применяют для выделения микроорганизмов из мест их естественного местообитания.

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других.

По физическому состоянию питательные различают



## Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

жидкие, плотные и сыпучие среды.

Жидкие среды широко применяются для определения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена.

Плотные среды используются для выделения чистых культур, для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и т.п.

Сыпучие среды (разваренное пшено, отруби, почва) применяются в промышленной микробиологии.

Для уплотнения сред используют агар-агар, желатину, кремнекислый гель.

Агар-агар применяют особенно часто. Это сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. В воде агар-агар образует гели, плавящиеся при  $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а затвердевающие при  $t \approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Чаще всего агар-агар добавляют к средам в количестве 2 %. Среду с внесенным в нее агар-агаром нагревают на кипящей водяной бане до полного расплавления агар-агара.

Желатина – белок, получаемый вывариванием костей и хрящей животных. Ее добавляют к жидким средам в количестве 10-15 %. Образующий желатиной гель плавится при  $t = 23\text{-}26\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами микроорганизмов. В связи с этим в качестве уплотняющего средства применяется редко.

Кремнекислый гель (силикагель) используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава так он является веществом неорганической природы.



## Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

Питательные вещества необходимо вносить в среды в количествах, достаточных для обеспечения хорошего роста микроорганизмов. Для различных микроорганизмов эти количества различны, однако имеются общие принципы, которыми нужно руководствоваться при составлении питательных сред. считается, что для нормального развития микроорганизмов необходимые элементы следует вносить в том соотношении, в котором они находятся в микробной клетке. Но, как правило, концентрации и соотношения компонентов подбираются с таким расчетом, чтобы они обеспечивали оптимальное течение интересующего процесса, так как далеко не всегда увеличение биомассы идет параллельно биосинтезу метаболитов (биологически активных веществ).

В большинстве случаев среды готовят на водопроводной воде и микроэлементы в них не добавляются.

Универсальных сред, одинаково пригодных для выращивания любого микроорганизма, нет.

### 3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Лабораторные весы, рН-метр; ареометром Баллинга, водяная баня, мерный стакан, мерная колба, колбы, пипетки, шпатели, чашки Петри, агар-агар,  $NaCl$  в порошке,  $KNO_3$  в порошке,  $K_2HPO_4$  в порошке,  $MSO_4 \cdot 7H_2O$  в порошке, глюкоза в порошке,  $HCl$ ,  $NaOH$ .



## 4. ЗАДАНИЕ

Приготовить жидкие и агаризованные среды: сусло-агар; синтетическую среду Чапека жидкую и агаризованную.

## 5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

5.1. Приготовить сусло-агар. Для этого отмерить 1 л неохмеленного пивного сусла мерным стаканом.

5.2. Поместить в колбу и измерить ареометром Баллинга содержание сахара. Для дрожжей оно должно оставлять 6-8°, при необходимости до нужной крепости (по сахарам) сусло развести водопроводной водой

5.3. В полученную смесь ввести агар-агар в количестве 2 %. Среду с внесенным в нее агар-агаром нагреть на кипящей водяной бане до полного расплавления агар-агара.

5.4. Приготовить синтетическую среду Чапека. Для этого взвесить на лабораторных весах требуемые реактивы в следующих количествах (г/л): глюкоза – 20,0;  $NaCl$  - 0,5;  $KNO_3$  -1,0;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5 г/л.

5.5. Отмеренные количества реактивов поместить в 1-литровую мерную колбу и довести объем водопроводной водой до риски. Тщательно перемешать содержимое до полного растворения.

5.6. В полученную смесь ввести агар-агар в количестве 20 г/л. Среду с внесенным в нее агар-агаром нагреть на кипящей водяной бане до полного расплавления агар-агара.



## Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

5.7. Измерить pH приготовленных сред. Величина pH должна составлять 7,0-7,3, если pH ниже данной величины, то его нужно довести введением нескольких капель *NaOH*, если выше – введением *HCl*.

5.8. Разлить горячие питательные среды по чашкам Петри и оставить для остывания и затвердевания.

## 6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

6.1. Укажите наименование и цель работы.

6.2. Укажите состав приготовленного Вами сусло-агара.

6.3. Приведите состав приготовленной Вами синтетической среды Чапека.

6.4. Укажите pH полученных питательных сред.

6.5. Сделайте вывод об условиях использования той или иной среды.

## 7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

7.1. Для каких целей используют питательные среды?

7.3. Как классифицируются питательные среды по своему составу, назначению и физическому состоянию?



## Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

74. Что такое естественные (натуральные) питательные среды?
75. Что такое синтетические питательные среды?
76. Что обеспечивают элективные питательные среды?
77. Что такое дифференциально-диагностические (индикаторные) питательные среды?
77. Для чего применяются жидкие, плотные и сыпучие среды?
79. Что представляет собой агар-агар?
- 7.10. Что представляет собой желатина, для чего она добавляется в питательные среды?

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека . Ростов н/Д : Феникс. 2008. — 231 с.
2. Концепции современного естествознания / И.А. Аистов, П.А. Голиков, В.В. Зайцев. – СПб: Питер, 2005. – 205 с.3. Бочева С.В. Основы биотехнологии. — Ростов-н-Д, 1997.—228 с.
- 3 Биотехнология: учебник / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воонина.- -СПб: ГИОРД, 2008. – 703 с.
- 4 Проведение лабораторно-практических работ по предмету «Микробиология» для подготовки специалистов по учебной



Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов  
группе профессий «Оператор биотехнологических производств».  
— Л., 2004. — 48 с.