***23. Mitybinės terpės paruošimas mikroorganizmams auginti***

Mikroorganizmų kultūros auginamos sterilioje aplinkoje ant standžių agarizuotų mitybinių terpių Petri lėkštelėse arba skystose mitybinėse terpėse kolbose. Mitybinių terpių galima įsigyti specializuotose cheminių reagentų parduotuvėse arba pasigaminti patiems. Kadangi mitybinės terpės sterilizavimas atliekamas greitpuodyje, šį etapą turėtų atlikti pats mokytojas.

**Priemonės Luria-Bertani (LB) mitybinei terpei gaminti:** cheminė stiklinė (1 l)**\***,matavimo cilindras**\***,greitpuodžio rinkinys\* (3 stikliniai buteliai (0,5 l) su užsukamais dangteliais, greitpuodis), svarstyklės\*, kaitinimo plytelė\*, stiklinė lazdelė**\***,agaras**\***, sausa Luria-Bertani (LB) mitybinė terpė mikroorganizmams auginti**\***, sacharozė, degiklis arba spiritinė lemputė, vanduo.

**Mitybinės terpės ruošimas**

*1. Terpės sudedamųjų dalių kiekio apskaičiavimas*

Į sterilizavimo indą galima pilti mitybinės terpės ne daugiau kaip trečdalį indo tūrio. Į tris 0,5 l talpos sterilizavimo butelius pilama po 150 ml mitybinės terpės.

Mitybinės terpės sudėtis:

*2,5 proc. Luria-Bertani mitybinės terpės,*

*2 proc. sacharozės (valgomojo cukraus) (nebūtina, jei bus auginamos tik bakterijos),*

*2 proc. agaro.*

450 ml terpės paruošti reikės 13,5 g LB terpės, 9 g agaro ir 9 g sacharozės. Terpei ruošti tinka ir vandentiekio vanduo.

2. *Mitybinės terpės sudedamųjų dalių svėrimas, tirpalo ruošimas*

Visi terpės komponentai pasveriami. Į 1 litro talpos cheminę stiklinę suberiama pasverta LB terpė (13,5 g) ir sacharozė (9 g), įpilama vandens iki 450 ml žymos ir maišant medžiagos ištirpinamos. Matavimo cilindru terpė išpilstoma į 0,5 l talpos butelius po 150 ml. Mitybinei terpei standumo suteikia agaras. Agaro dedama po 3 g į kiekvieną butelį su 150 ml mitybinės terpės. Įdėjus agaro terpė išmaišoma (agaras neištirps, tik pasklis vandenyje), buteliai **nesandariai** užsukami ir statomi į greitpuodį. Pasirenkamas reikalingas terpės tūris ir perskaičiuojamas konkrečiam tyrimui. Nerekomenduojama sterilizuotos terpės laikyti ilgesnį laiką.

3. *Mitybinės terpės sterilizavimas*

Pagaminta ir į butelius išpilstyta terpė sterilizuojama greitpuodyje 45 minutes. Susipažįstama su greitpuodžio naudojimo instrukcija ir jis paruošiamas sterilizavimui. Į greitpuodį įpilama 500 ml vandens. Būtina įpilti vandens ne mažiau, negu nurodyta minimali jo riba, kad nebūtų sugadintas puodas. Į greitpuodį su vandeniu sustatomi visi trys buteliai ir greitpuodis sandariai uždaromas. Butelių užsukamus kamščius galima apsukti aliuminio folija, taip kamšteliai bus ilgiau naudojami.

Prieš statant greitpuodį ant kaitinimo plytelės, patikrinama, ar tikrai dangtis tinkamai ir sandariai uždarytas. Įsitikinama, ar nėra mechaninių pažeidimų. Šiame prietaise naudojamas aukštas slėgis. Jeigu kaitinimo pradžioje apie greitpuodžio dangtį pamatoma garų, puodas tuoj pat nuimamas nuo kaitinimo plytelės, atvėsinamas. Patikrinama, ar sandariai uždarytas dangtis, ar švarūs apsauginiai vožtuvai, ar puode reikiamas vandens kiekis. **Karšto greitpuodžio negalima liesti ir atidaryti!**

Vandeniui greitpuodyje užvirus, sterilizuojama 30–45 minutes. Baigus sterilizuoti greitpuodis nukeliamas nuo kaitinimo plytelės, paliekamas atvėsti. Kaitinimo plytelė išjungiama.

Maždaug po 20–30 min. greitpuodis atidaromas. Negalima atidaryti greitpuodžio, kol jis neatvėso ir nesumažėjo slėgis puodo viduje. Atvėsinus ir išleidus garus pro sklendę, nuimamas dangtis. Puodo dangtį reikia atidaryti nukreipiant jį nuo savęs. Karšti buteliai su terpe atsargiai, vengiant nusiplikyti, išimami. Butelių kamščiai sandariai užsukami. Sukamuoju judesiu, bet neplakant, terpė buteliuose sumaišoma.

4. Stiklinių Petri lėkštelių sterilizavimas

**Stiklinės** Petri lėkštelės, į kurias bus pilstoma terpė, gali būti sterilizuojamos greitpuodyje. Kartu karščiui atsparioje stiklinėje, uždengtoje aliuminio folija, sterilizuojami ausų krapštukai ar vatos kamšteliai. Esant galimybei Petri lėkštelės sterilizuojamos sausu karščiu orkaitėje (technologijų kabinete). Sterilizuojama 2 val. 160–170 °C temperatūroje. **Plastikinės** Petri lėkštelės yra sterilioje pakuotėje. Šių vienkartinių lėkštelių sterilizuoti negalima.

4. *Mitybinės terpės išpilstymas*

Kiek praaušusi (iki 50 °C) sterili mitybinė terpė išpilstoma į paruoštas sterilias Petri lėkšteles. Mitybinę terpę pilstyti reikia švarioje aplinkoje, šalia degančio dujų degiklio ar spiritinės lemputės liepsnos, saugantis mikroorganizmų iš aplinkos patekimo į terpę. Butelį su terpe laikant šalia liepsnos nuimamas kamštis ir butelio kaklelis trumpai perbraukiamas per liepsną (nudeginamas).

Petri lėkštelė minimaliai praveriama nuo savęs ir į ją įpilama mitybinės terpės tiek, kad ji padengtų lėkštelės dugną (tūris priklauso nuo lėkštelių dydžio: 7–10 ml – vienkartinėms 55 mm Petri lėkštelėms, 20–25 ml – stiklinėms 90 mm lėkštelėms). Terpė pilstoma greta liepsnos. Tik įpylus terpę, lėkštelė kuo skubiau uždengiama. Jei reikia, kad terpė geriau pasklistų, lėkštelė atsargiai pavartoma. Rekomenduojama paruoštą mitybinę terpę į Petri lėkšteles išpilstyti iš karto.

Lėkštelės sudedamos viena ant kitos kaip bokštas – taip išvengiama kondensato ant dangtelių. Palaukiama, kol terpė sustandės. Taip paruoštas lėkšteles galima laikyti keletą parų šaldytuve +4 °C temperatūroje. Lėkštelės laikomos apverstos, terpe į viršų.

Tokiu pat principu galima patiems pasiruošti kitokias terpes, kuriose vietoj LB miltelių naudojamas kitas maisto medžiagų (turinčių anglies) šaltinis: sultinys, želatina, druskų ir cukraus mišinys ir kt. Terpei standinti visada naudojamas 1,5–2 proc. agaras, net ir tuo atveju, jei kaip maisto medžiaga buvo naudota želatina.

**Vaizdo įrašas** *„Mitybinės terpės paruošimas mikroorganizmams auginti“.*