



ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
УПРАВЛЕНИЕ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ И ПОВЫШЕНИЯ
КВАЛИФИКАЦИИ

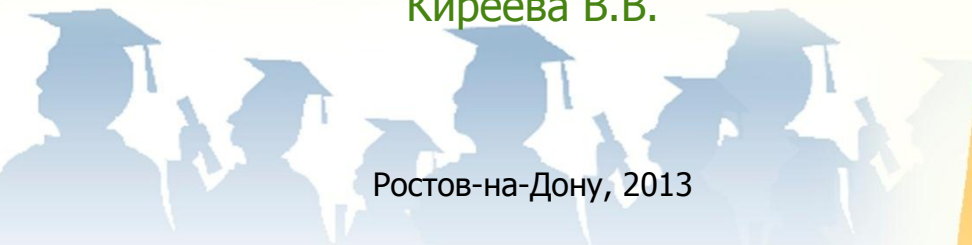
Кафедра «Производственная безопасность»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ к выполнению лабораторной работы

«Способы стерилизации питательных сред»

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 стерилизации питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Составитель



Киреева В.В., д. биол. н., профессор





Оглавление

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ	4
2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.....	4
3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ	7
4. ЗАДАНИЕ	8
5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ.....	8
6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ..	10
7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ..	10
ЛИТЕРАТУРА.....	11



1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Овладеть способами стерилизации питательных сред для микробиологических исследований.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Стерилизация является важнейшим и необходимым приемом в микробиологической практике.

Стерилизация (обеспложивание) – это обработка материала, в результате которой достигается полное уничтожение микроорганизмов и их спор. Оно осуществляется физическими (нагревание, облучение), химическими (обработка дезинфицирующими, антисептическими средствами) методами.

Стерилизации подвергаются среды, посуда, инструменты и другие предметы для предотвращения развития посторонних микробов в исследуемых культурах. Существует много способов стерилизации. Целесообразность применения каждого из них определяется особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими свойствами, химическим составом, целью исследования.

Питательные среды стерилизуют, в основном, автоклавированием. Оно основано на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. В режиме стерилизации указывается дополнительное давление – 0,5 ати (атмосфер избыточных), 1,0 ати и т.д. Температура и длительность автоклавирования определяются составом питательной среды. Среда, содержащая вещества, не выдерживающие нагре-

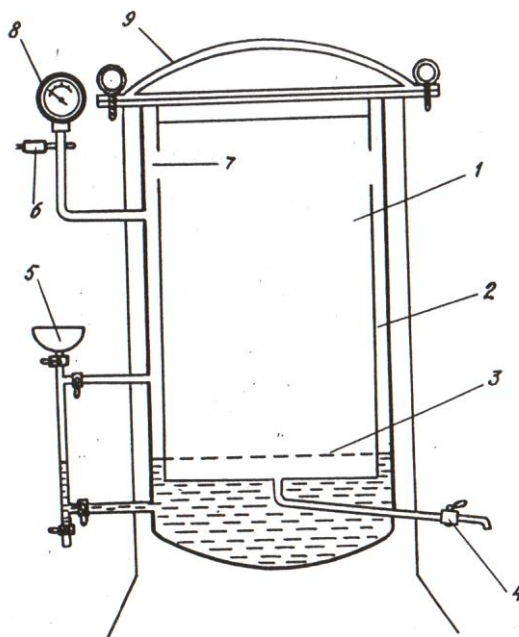


Способы стерилизации питательных сред

вания до 120 °С, стерилизуют при 0,5 ати. Например, молоко, дрожжевой автолизат, среды с желатиной стерилизуют при 0,5 ати в течение 15 мин. Среды, содержащие сахар, витамины, соки стерилизуют при 0,5 ати в течение 20-30 мин. Мясопептонные среды автоклавировуют при 1 ати. Картофельную среду и почвенные вытяжки – при 1,5 ати в течение 30 мин.

Автоклавирование осуществляется в специальных устройствах, называемых автоклавами.

Автоклав – это металлический двустенный котел, способный выдерживать высокое давление. Автоклавы бывают различной конструкции, но принципиальное устройство любого автоклава одно и то же (рис. 1).





Способы стерилизации питательных сред

Рис. 1. Схема устройства автоклава:

1 – стерилизационная камера; 2 - водопаровая камера; 3 - подставка для размещения стерилизуемых материалов; 4 – кран для выхода воздуха; 5 – воронка для заполнения автоклава водой; 6 - предохранительный клапан; 7 - отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 – манометр; 9 – крышка автоклава.

Дробная стерилизация применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температуры выше 100 °С. При этом обработку ведут в автоклаве с незавинченной крышкой «тепучим паром» 3 раза в течение 30-40 мин с перерывом в 1 сутки. В промежутках между прогреваниями среды помещают в термостат с $t = 30$ °С для прорастивания спор. Среды, не выдерживающие нагрева выше 100 °С, прогревают при $t = 60-70$ °С 4-5 дней подряд.

Пастеризация – однократный прогрев материала при температуре ниже 100 °С (обычно 70-75 °С). Она не обеспечивает полной стерильности субстрата, так как способствует уничтожению только бесспорных форм микроорганизмов. В микробиологической практике пастеризация используется для выделения спорообразующих микроорганизмов, а в пищевой промышленности – для обработки продуктов, теряющих вкусовые качества при кипячении (молока, ягодных и фруктовых соков, вин, пива и др.).

Стерилизация фильтрованием – применяется в тех случаях, когда субстраты не выдерживают нагревания (белки, сыворотки, антибиотики, витамины, летучие вещества и др.). Для этого используют различные фильтры – мембранные, асбестовые и др.



Способы стерилизации питательных сред

Мембранные фильтры представляют собой диски, напоминающие бумажные, толщиной 0,1мм – 35 мм. Они изготавливаются из коллодия, ацетата целлюлозы и других материалов. В зависимости от размеров пор они обозначаются №1, 2, 3, 4, 5. Наиболее пригоден для стерилизации фильтр № 1 (средний d пор = 0,35 мкм).

Фильтры Зейца представляют собой плотные диски, изготовленные из смеси асбеста и целлюлозы (марка СФ) (рис. 2).

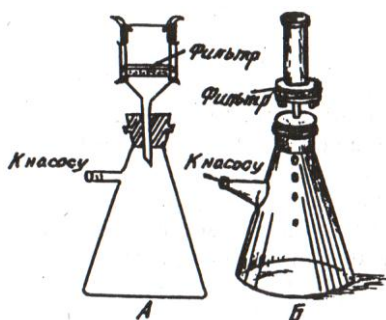


Рис. 2. Приборы для стерилизации с помощью фильтра Зейца с различными держателями фильтра.

Фильтр Зейца закрепляется с помощью резиновой пробке в премнике фильтра в колбе Бунзена. Отводная трубка присоединяется к вакуумному (водоструйному) насосу.

3. ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Автоклав, колба Бунзена, вакуумный (водоструйный) насос, стерильный фильтр Зейца, специальный держатель для фильтра Зейца, пипетки, шпатели, чашки Петри, ватно-марлевые



пробки.

4. ЗАДАНИЕ

3.1. Ознакомиться с устройством автоклава и простерилизовать питательные среды (сусло-агар, синтетическую среду Чапека агаризованную) автоклавированием.

3.2. Простерилизовать фильтрованием через стерильный фильтр Зейца жидкое сусло.

3.3. Сопоставить результаты обеспложивания, полученные различными методами.

5. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

5.1. Жидкие питательные среды (сусло и синтетическую среду Чапека) разлить в пробирки по 5-6 мл и закрыть ватно-марлевыми пробками. Среда не должна доходить до пробки на 5-6 см.

5.2. Агаризованные среды (сусло-агар и агаризованную синтетическую среду Чапека) разлить в чашки Петри по 20-30 мл.

5.3. Поместить пробирки с жидкими средами и чашки Петри с агаризованными средами в автоклав и провести стерилизацию при $P = 0,5$ ати в течение 15 мин согласно инструкции для автоклава:

5.3.1. Залить воду в водопаровую камеру автоклава через воронку (5).

5.3.2. Поместить стерилизуемые пробирки и чашки со сре-



Способы стерилизации питательных сред

дами в стерилизационную камеру (1) на подставку (3) не слишком плотно друг к другу, чтобы пар мог свободно проходить между ними.

5.3.3. Плотно закрыть и завинтить крышку автоклава (9).

5.3.4. Открыть кран для выхода воздуха (4) и включить нагревающее устройство. Отметить время, когда через кран (4) начнет выходить пар, вытесняющий из автоклава холодный воздух.

5.3.5. Пар выпускать не более 15-20 мин, иначе в автоклаве останется мало воды, после чего закрыть кран и следить за манометром (8) за повышением давления.

5.3.6. После достижения давления 0,5 ати, поддерживать его в течение 20 мин.

5.3.7. По истечении времени стерилизации прекратить нагревание автоклава.

5.3.8. Подождать, когда давление в автоклаве сравняется с атмосферным (стрелка манометра упадет до 0), открыть кран (4), на который предварительно надеть резиновый шланг, и отвести пар в сосуд с водой.

5.3.9. Выдержать простерилизованные среды в течение 2-3 суток при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в термостате для проверки стерильности.

5.4. Простерилизовать жидкое сусло фильтрованием. Присоединить фильтр Зейца с помощью резинового шланга к вакуумному насосу.

5.5. Налить жидкое сусло в фильтр Зейца.

5.6. Включить вакуумный (водоструйный) насос и простерилизовать сусло фильтрованием.



6. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

- 6.1. Укажите наименование и цель работы.
- 6.2. Опишите способ автоклавирования питательных сред.
- 6.3. Опишите способ стерилизации питательных сред фильтрованием с помощью фильтра Зейца.
- 6.4. Сделайте вывод о преимуществах и недостатки использованных Вами способов обеспложивания материала.

7. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

- 7.1. Что такое стерилизация?
- 7.3. Назовите виды стерилизации питательных сред.
- 7.4. Каково устройство автоклава?
- 7.5. На чем основана стерилизация автоклавированием?
- 7.6. В каких случаях применяется стерилизация «текучим паром»?
- 7.7. В чем состоит пастеризация?
- 7.8. Как устроен фильтр Зейца?



Способы стерилизации питательных сред

7.9. Как производится стерилизация фильтрованием?

ЛИТЕРАТУРА

1. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека . Ростов н/Д : Феникс.

2008. — 231 с.

2. Биотехнология: учебник / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воронина.- СПб: ГИОРД, 2008. – 703 с.

3. 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.

4. Проведение лабораторно-практических работ по предмету «Микробиология» для подготовки специалистов по учебной группе профессий «Оператор биотехнологических производств». — Л., 2004. — 48 с.