

Лабораторная работа № 1

Оборудование микробиологической лаборатории и подготовка посуды к стерилизации

Теоретическая часть

Методы стерилизации питательных сред и посуды. Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. 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. Различают *термическую* и *холодную* стерилизацию. **Способы термической стерилизации:** прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. **Методы холодной стерилизации:** стерилизация фильтрованием, газообразными средствами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяется в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

Стерилизация питательных сред насыщенным паром под давлением (автоклавирование). Совместное действие высокой температуры и давления пара обеспечивает особую эффективность данного способа (табл. 1).

Таблица 1 - Температура насыщенного пара при разных значениях давления

Давление		Температура, °С
Нормальное, атм	кПа	
1,0	101,32	100
1,5	151,98	111
2,0	202,65	121
2,5	251,20	128
3,0	299,75	134

При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121 °С. Стерилизацию текучим паром под давлением осуществляют в автоклавах. Автоклав представляет собой металлический двустенный резервуар, способный выдерживать высокое давление, в который помещают стерилизуемый материал на специальную подставку. Предметы следует размещать не

слишком плотно, так как пар должен проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. По окончании времени стерилизации автоклав открывают, когда давление в нем сравнивается с атмосферным. **Преждевременное открывание крана автоклава недопустимо**, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала. **К работе с автоклавом допускаются только подготовленные лица!**

Подготовка сред к стерилизации. При автоклавировании 3 - 5 % жидкости теряются в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию. Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками с бумажными колпачками. Стеклянные, резиновые, корковые и другие пробки заворачивают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой.

Выбор режима автоклавирования. В микробиологической практике стерилизацию в автоклавах осуществляют при температуре в пределах 111-138 °С, т.е. от 0,5 до 2,5 атм. Температура ниже 111 °С не может считаться надежной; а выше 138 °С, как правило, не является необходимой, к тому же, чем выше давление пара, тем сложнее условия эксплуатации автоклава. Микробиологи чаще всего стерилизуют среды при 0,5 и 1 атм.

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются, прежде всего, их составом, термоустойчивостью или термоллабильностью компонентов. Такие легко разрушающиеся субстраты, как молоко или желатиновые среды, а также субстраты, содержащие сахара, витамины (пивное сусло, соки, дрожжевой автолизат и др.) обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-30 мин. Мясопептонные среды можно стерилизовать при 1,0 атм 20 мин. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поэтому их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при 160 °С в течение 2 или 1 ч при 170 °С. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см. После автоклавирования среды для проверки стерильности выдерживают 2-3 сут. в термостате при 30 °С. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново.

Дробная стерилизация (тиндализация) и пастеризация. Тиндализация, дробная стерилизация, была предложена в 1877 г. Тиндалем. Она применяется для сред, портящихся под действием температур выше 100 °С. Тиндализацию осуществляют текучим паром, в автоклаве с незавинченной крышкой или в аппарате Коха. Среды прогревают несколько

раз по 10-15 мин. Между прогреваниями среды ставят в термостат при температуре 30 °С на 8-12 ч для прорастания жизнеспособных спор. Среда, не выдерживающая нагревания при 100 °С, прогревают более осторожно при 60 - 80 °С через каждые 8-12 ч 4-5 дней подряд.

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100 °С известен под названием **пастеризация**. Этот метод, предложенный Пастером, предназначен для уничтожения только бесспорных форм микроорганизмов. Следовательно, в подавляющем большинстве случаев он не обеспечивает стерильности. Пастеризацию проводят при 60-80 °С 10 - 30 мин. Этот процесс используют в пищевой промышленности для обработки молока, фруктовых соков, вина, пива и др.

Стерилизация фильтрованием. Фильтрованием стерилизуют синтетические среды строго определенного состава, которые содержат легкоразрушающиеся или летучие компоненты - витамины, аминокислоты, белки, углеводы, антибиотики и др. Фильтрование жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и др.

Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,20 мкм. Наиболее широкое распространение в микробиологической практике получили мембранные фильтры, которые в зависимости от величины пор применяют для фильтрования и стерилизации. Для стерилизации используют отечественные фильтры фирм «Владипор», «Владисарт» с диаметром пор 0,20 мкм.

Плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой, называются фильтрами Зейтца. В зависимости от диаметра пор они обозначаются разными индексами. Стерилизующими являются СФ-3 и СФ-4.

Мембранные фильтры стерилизуют автоклавированием при 1 атм 15 мин или длительным кипячением.

Стерилизация стеклянной посуды. Основным способом стерилизации стеклянной посуды является обработка ее сухим горячим воздухом при температуре не выше 180°С в течение 1-3 ч (табл. 2). При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Стерилизацию осуществляют в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации и обеспечивающих автоматическое поддержание необходимой температуры.

Таблица 2 - Время, необходимое для стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

Температура, °С	Время, мин
140	180
150	150
160	120

Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогрева. После этого ее загружают в стерилизатор (или в сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный надежный прогрев стерилизуемого материала. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80 °С, так как при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться.

Стерилизация инструментов и приборов. Мелкие металлические инструменты - петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели - стерилизуют прокаливанием в пламени (т.е. нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при посевах культур и разливе сред. В пламени погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Шприцы лучше всего стерилизовать сухим жаром при 160 °С либо в собранном, либо в разобранном виде. В первом случае длительность стерилизации 75, во втором - 60 мин. Собранные шприцы вместе с иглой стерилизуют в пробирке, закрытой ватной пробкой, разобранные заворачивают в бумагу или ткань. Можно стерилизовать шприцы и в автоклаве при 1 атм в течение 15-20 мин. Автоклавируют их только в разобранном виде, иначе они повреждаются.

Стерилизация газообразными веществами. Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например, центрифужные пробирки стерилизуют газовым методом. Для газовой стерилизации применяются только те соединения, которые обладают спороцидными свойствами. Это оксид этилена, метилбромид, оксид пропилена, формальдегид, глютаральдегид, бета-пропиолактон, озон и др. Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. Стерилизуемые объекты, помещаемые в камеру, упаковывают как при стерилизации в автоклаве или сушильном шкафу. При проведении газовой стерилизации строго соблюдают правила работы с ядовитыми газообразными веществами.

Стерилизация облучением

Для стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов используют различные виды излучений: инфракрасное, ультрафиолетовое, рентгеновские лучи. Чаще других в микробиологической практике используют ультрафиолетовое облучение. Мощность ультрафиолета измеряется в бактах. Доза УФ-излучения, губительная для различных видов микроорганизмов (кроме спор), составляет 5 мкб/см².

Экспериментальная часть

Цель работы: ознакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории, с особенностями подготовки помещения, оборудования и лабораторной посуды к работе с микроорганизмами.

Материалы и оборудование: термостат, центрифуги, автоклав, сушильный шкаф, фильтры, бактерицидные лампы, пипетки, чашки Петри, шпатели, пробирки, колбы, предметные стекла, пергаментная бумага, вата, марля.

Ход выполнения работы. Ознакомьтесь с устройством и применением основных приборов и оборудования микробиологической лаборатории. В соответствии с описанием этого процесса в теоретической части выполните следующие действия, а именно подготовьте к стерилизации:

- 1) стеклянную посуду: пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри;
- 2) ватно-марлевые и резиновые пробки, металлические инструменты (ножницы, пинцеты, шприцы и иглы).

Контрольные вопросы:

1. Что такое стерилизация и какие виды стерилизации существуют?
2. Автоклавирование (принцип метода).
3. Как осуществляется подготовка сред к стерилизации?
4. Как осуществляется выбор режима автоклавирования?
5. В чем отличия между дробной стерилизацией и пастеризацией?
6. Стерилизация фильтрованием. Виды фильтров.
7. Стерилизации стеклянной посуды.
8. Стерилизация инструментов и приборов.
9. Стерилизация газообразными веществами.
10. Стерилизация облучением.