

Лабораторная работа 3.

СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Объяснение:

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных культур является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет собой двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред. Во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и, в особенности, протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных помещениях – боксах или ламинар-боксах и с использованием стерильных материалов и инструментов.

Стерилизация может быть достигнута следующими методами:

- влажным (текучим) жаром (автоклавирование, кипячение, пастеризация, дробная стерилизация – тиндализация);
- сухим жаром (нагревание горячим воздухом в сухожаровых шкафах, обжигание);
- с помощью различных химических веществ (стерилизующих агентов);
- фильтрованием через бактериальные фильтры;
- облучением ультрафиолетовыми лучами.

Стерилизация посуды

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Культуральные сосуды (колбы, пробирки, банки, чашки Петри и т.п.) перед заполнением их питательными средами стерилизуют завернутыми в плотную бумагу сухим жаром в сухожаровом шкафу, размещая на металлических полках. Продолжительность стерилизации при 150°C – 2,5 ч., при 160°C – 2 часа. За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Следует иметь ввиду, что для этого минимального времени, необходимого для стерилизации, требуется вносить поправку на время, необходимое для нагрева камеры до нужной температуры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор патогенов. В этом случае посуду заворачивают в фольгу или крафт-бумагу, сверху – в целлофан; верхнюю часть пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавируют под давлением 2 атм. (133°C) в течение 25-30 мин.

Стерилизация инструментов

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и др.) производится прокаливанием сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 160°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. При этом режущие части инструментов заворачивают в марлю или вату, чтобы уберечь от ударов. Металлические инструменты нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе работы инструменты еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом, затем обжигая в пламени спиртовки. После этого каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенной в пачку. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его снова следует

простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, тонкие лезвия) могут тупиться при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

Стерилизация материалов

Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин. Бумажные матрасики из плотной офисной бумаги можно стерилизовать в сухожаровом шкафу, однако со временем бумага темнеет и становится хрупкой.

Стерилизация ламинар-бокса и операционной комнаты.

Стерилизация операционной комнаты и ламинар-бокса является необходимой процедурой, в результате которой должны быть устранены источники возможной инфекции тканевых и клеточных культур (бактерии, споры, грибы).

Помещение, где осуществляются стерильные операции должно содержаться в абсолютном порядке, поэтому в первую очередь его очищают от грязи и пыли. Грязь удаляют тщательным отмыванием водой с мылом рабочей поверхности столов, стен, пола, углов. Затем пол протирают дезинфицирующим раствором («Доместос» или др. чистящее средство), столы протирают спиртом. Вторым этапом стерилизации является облучение ультрафиолетовым светом, который губительно действует на вегетирующие формы микроорганизмов.

Ламинар-боксы предназначены для выполнения работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров. Внутренние поверхности ламинар-бокса перед работой протирают спиртом. За 10-20 минут до начала работы включают ультрафиолетовую бактерицидную лампу.

Перед работой в ламинар-боксе следует плотно закрыть дверь в асептическую комнату, одеть чистый халат, шапочку, маску, бахилы. Протереть руки спиртом. В процессе работы недопустимо открывать двери в операционную комнату. Нужно воздержаться от лишних разговоров и ненужных движений, периодически протирать руки спиртом, не выносить стерильные инструменты и материалы из ламинар-бокса. Использовать инструмент только для одноразовой операции и не употреблять его, если возникло подозрение, что он соприкасался с нестерильной поверхностью. Необходимо избегать движений руками над открытыми чашками Петри и сосудами со стерильной средой. Недопустимо прерывать выполнение операции, вынимая руки из ламинар-бокса.

Стерилизация воды и питательных сред

Существуют два основных способа стерилизации питательных сред - автоклавирование и фильтрование. В первом случае разлитые в колбы или пробирки питательные среды и дистиллированную воду закрывают ватными пробками и фольгой и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм. в течение 20 минут. Можно сначала методом автоклавирования простерилизовать большое количество среды в одном объеме, а затем в ламинарном боксе разлить ее по стерильной посуде для культивирования.

Время термической обработки зависит от объема посуды, в которую разлита среда. Например пробирки со средой стерилизуют 15 минут при температуре 115°C, а колбы содержащие 500 мл среды дезинфицируют 30 минут при температуре 121°C и 45 минут при 115°C.

Во втором случае используют стерильные фильтры Зейтца, Беркефельда, мембранные фильтры, незаменимые для приготовления сред с термолабильными компонентами (некоторые стимуляторы роста, витамины, антибиотики).

аминокислоты, растительные экстракты), которые разрушаются при автоклавировании. Фильтрация сред (холодная стерилизация) применяется также для приготовления смесей ферментов и выделения изолированных протопластов, сред с биологически активными компонентами.

Стерилизация растительного материала

Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Наиболее часто употребляют соединения, содержащие активный хлор (гипохлорит натрия, хлорную известь, гипохлорит кальция, хлорамин), двухлористую ртуть (сулему), перекись водорода, этиловый спирт, синтетические комплексные стерилизаторы (лизоформин, тетрамин и др.). Реже используют бром, серную кислоту и в особых случаях пользуются антибиотиками.

Цель: познакомиться с методами стерилизации и правилами асептики, принятыми в биотехнологической лаборатории.

Материалы и оборудование: стеклянная посуда (колбы, чашки Петри, пробирки, банки), скальпели, пинцеты, крафт-бумага, дистиллированная вода, алюминиевая фольга.

Ход работы:

Стеклянную посуду тщательно вымыть с использованием моющего средства (детергента), загрязненную посуду предварительно замочить в растворе дихромата калия в концентрированной серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду ополоснуть дистиллированной водой и высушить в сушильном шкафу. Высушенную посуду завернуть в плотную крафт-бумагу и стерилизовать в сухожаровом шкафу 2 часа при температуре 160°C.

Скальпели, пинцеты, бумажные матрасики завернуть в крафт-бумагу и простерилизовать в сухожаровом шкафу 2 часа при температуре 160°C.

Дистиллированную воду разлить в колбы на 1/3 объема, закрыть фольгой и простерилизовать в настольном паровом стерилизаторе.

Все стерильные материалы разместить в ламинарной комнате.