

Предмет: «Эпизоотология и инфекционные болезни животных
с основами микробиологии и вирусологии»

Лабораторная работа № 3

Тема: Техника приготовления простых питательных сред.

Цель: выработать навыки приготовления простых питательных сред, изучить лабораторную посуду.

Время выполнения: 2 часа

Место проведения: аудитории 419, 426, межрайонная ветлаборатория

Дидактическое и методическое обеспечение: автоклав, сушильный шкаф, водяная баня, фильтровальные приборы, холодильник, аппарат для получения дистиллированной воды, пробирки, чашки Петри, колбы, вата, бумага, стеклянные трубки, спиртовки.

Питательные среды в сухом виде (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон), мясная вода, воронки, фильтровальная бумага, марля, электроплитка

Охрана труда на рабочем месте (отдельная инструкция)

Порядок и последовательность выполнения работы:

1. Внеурочная подготовка.

1.1. Самостоятельно подготовьтесь к лабораторной работе.

Изучите теоретический материал по учебнику Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; - Минск: РИПО, 2017 стр. 33-39, 55-60.

1.2. Подготовьте рабочую тетрадь.

1.3. Изучите инструкцию по охране труда.

2. Работа в лаборатории.

2.1. Пройдите входной контроль.

2.2. Подготовьте рабочее место и оборудование для работы.

2.3. Изучите методические указания и выполните задания:

Задание № 1. Ознакомьтесь с правилами работы с автоклавом и аппаратами, применяемыми в лабораторной практике.

Задание № 2. Изучите методику стерилизации в сушильном шкафу лабораторной посуды.

Задание № 3. Ознакомьтесь с методикой приготовления мясной воды, мясо-пептонного бульона и мясо-пептонного агара.

Задание № 4. Изучите методику разлива приготовленных питательных сред в пробирки и подготовка их к стерилизации.

2.4. Оформите выполненную работу в тетрадь.

2.5. Пройдите выходной контроль.

2.6. Приведите в порядок рабочее место.

3. Вопросы входного контроля: Google-тест

4. Методические указания по выполнению работы:

Задание № 1. Ознакомьтесь с правилами работы с автоклавом и аппаратами, применяемыми в лабораторной практике.

Способы стерилизации одним из основных условий работы в лаборатории является отсутствие на инструментах, посуде и в питательных средах микроорганизмов, уничтожение которых достигается стерилизацией (обеспложиванием).

В лабораторной практике стерилизация осуществляется:

- 1) прокаливанием на пламени;
- 2) кипячением;
- 3) сухим жаром (в сушильном шкафу);
- 4) водяным паром (в текучепаровом аппарате, автоклаве);
- 5) различными химическими веществами;
- 6) механическими способами (фильтрация).

Автоклав (стерилизатор паровой) – служит для стерилизации водяным паром под давлением он представляет собой массивный металлический котел, одетый снаружи кожухом и снабженный герметически закрывающейся крышкой. Внутри наружного котла находится другой котел меньшего диаметра. Между двумя котлами остается свободное пространство, куда поступает пар из парообразователя через патрубков. Парообразователь имеет воронку с кранами и водомерным стеклом, по которому определяют уровень воды. Подогрев осуществляют электричеством, реже газовыми или керосиновыми горелками. На предприятиях в автоклавы поступает технологический пар по трубам непосредственно из котельной.

При подогревании автоклава образуется пар, который через отверстие в днище внутреннего котла попадает во внутреннее пространство, где располагаются стерилизуемые предметы. Если закрыть выпускной кран, то образующийся пар, поступая в замкнутое пространство, поднимает давление и температуру. За повышением давления следят по показанию манометра, сообщаемого с внутренним пространством котла или парообразователя. Чтобы давление в автоклаве не превышало предельного (во избежание разрыва автоклава), устроен предохранительный клапан, который автоматически закрывается или открывается в зависимости от силы давления в аппарате. В нижней части автоклава устроен кран для спуска пара и воды после работы.

Текучепаровой аппарат (аппарат Коха) представляет собой металлический цилиндр, обшитый снаружи каким либо теплоизоляционным материалом, а внутри разделённый перегородкой на нижнюю часть и верхнюю часть. В нижнюю часть наливают воду, а на подставку верхней части ставят предметы, подлежащие стерилизации. Верхняя часть закрывается крышкой в которую вмонтирован термометр. Нагрев осуществляется электричеством, газовой горелкой. Началом стерилизации считается момент, когда пар начинает выходить из отверстия в верхней части аппарата непризывной струей, а термометр покажет температуру 100°C. Засекают время и продолжают стерилизацию (25-60 минут) в зависимости от материала. При такой стерилизации погибают только микробы в вегетативной форме.

Сушильный шкаф (печь Пастера) применяют для стерилизации сухим жаром. В сушильном шкафу стерилизуют пробирки, пастеровские пипетки, бактериологические

чашки, колбы и другую стеклянную посуду. Пробирки и колбы закрывают ватными пробками. Все стеклянные предметы заворачивают бумагу. Подлежащие стерилизации предметы размещают на полках. Предметы выдерживают 2 часа при температуре 150°C и 1 час при температуре 160°C. Началом стерилизации считается момент достижения требуемой температуры. На достаточную степень стерилизации указывает пожелтение ватных пробок бумаги.

Водяные бани – бывают различной формы, подогреваемые электричеством, газовыми или керосиновыми горелками. Нагревание в водяных банях осуществляется при 56-58°C в течение 1-2 часов. Перед стерилизацией в баню наливают воду и помещают в нее колбы или пробирки с материалом. Термометр помещают в пробирку с водой, которую тоже ставят в баню. Пробирки не должны касаться дна сосуда. Для этого их устанавливают в специальные штативы.

Задание № 2. Изучите методику стерилизации в сушильном шкафу лабораторной посуды.

Подготовка лабораторной посуды. Мытье лабораторной посуды имеет существенное значение. Плохо вымытая посуда может быть причиной неправильного результата лабораторных исследований и неудач при культивировании микроорганизмов.

Бывшую в употреблении посуду стерилизуют, моют горячей водой с мылом, применяя при этом ерши или кусочки фильтровальной бумаги. Вымытую посуду споласкивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Сильно загрязненную посуду (с остатками питательных сред) замачивают в растворе каустической соды на сутки. Для удаления органических веществ, применяют эфир, ацетон, бензин, спирт и другие органические растворители.

Особо тщательно готовят лабораторную посуду для культивирования вирусов. Бывшую в употреблении загрязненную посуду обеззараживают автоклавированием или химическими веществами (растворы хлорамина, щелочи), затем замачивают в растворе детергентов (ОП 7) на 18-20 часов, после чего кипятят 2 часа в щелочном растворе, ершат и промывают дистиллированной водой, нейтрализуют 1%-ным раствором соляной кислоты, ополаскивают дистиллированной водой.

Задание № 3. Ознакомьтесь с методикой приготовления мясной воды, мясо-пептонного бульона и мясо-пептонного агара.

Приготовление простых питательных сред.

Мясная вода – мясо освобождают от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают 2 или 4-х кратным количеством воды и кипятят в течение 1 часа. Жидкость фильтруют через вату или полотно, затем через фильтровальную бумагу.

Фильтрат измеряют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой. Приготовленную мясную воду разливают по бутылкам, стерилизуют 30-40 мин. в автоклаве при давлении 1 атм.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) - к мясной воде добавляют 1% пептона 0,5% химически чистой поваренной соли и кипятят до растворения пептона. Затем в горячем бульоне определяют рН и добавлением 10%-ного раствора углекислой соды или децинормального раствора едкого натра устанавливают рН 7,2 - 7,4. После этого бульон еще раз кипятят 15-20 мин. и фильтруют через двойной бумажный фильтр.

Готовый бульон разливают по пробиркам и колбам, стерилизуют 15-20 мин. в автоклаве при давлении в 1 атм.

Мясо-пептонный агар (МПА) - мясо-пептонный бульон добавляют 2-3% агар-агара и расплавляют его нагреванием в автоклаве или текучепаровом аппарате Коха. В расплавленном агаре определяют рН и устанавливают рН 7,2-7,4 добавлением 10%-ного раствора углекислой соды или децинормального раствора едкого натра. Для просветления среды добавляют на 1 литр расплавленного и охлажденного до 50°C агара белок 1 куриного яйца или 10 мл кровяной сыворотки, после чего нагревают 20 мин. в автоклаве при температуре 105°C для свертывания белка, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр (в нагретом автоклаве), разливают по колбам и пробиркам, затем стерилизуют в автоклаве при давлении в 1 атм. В течение 30 мин.

Сухие питательные среды – в настоящее время в лабораторной практике широко используют готовые сухие питательные среды, выпускаемые промышленностью. Их растворяют в дистиллированной воде, разливают по пробиркам, колбам или бактериологическим чашкам и при необходимости стерилизуют в автоклаве или текучепаровом аппарате.

Задание № 4. Изучите методику разлива приготовленных питательных сред в пробирки и подготовка их к стерилизации.

Разлив питательных сред - питательные среды по пробиркам и колбам разливают с помощью приспособления, состоящего из штатива и стеклянной воронки, на конце которой укреплен резиновая трубка, снабженная зажимом и стеклянным наконечником. С этой же целью используют специальные дозирующие устройства – дозаторы. Колбы и пробирки со средами закрывают пробками, упаковывают в металлические сетки и стерилизуют в автоклаве 30 мин. Ватные пробки перед стерилизацией необходимо обернуть бумагой. Для получения скошенного агара, мясо-пептонный агар в пробирках после стерилизации охлаждают в наклонном положении.

5. Вопросы выходного контроля:

5.1. Назовите способы уничтожения микроорганизмов.

5.2. Какие цели преследует стерилизация.

5.3. Какие основные методы культивирования микроорганизмов.

5.4. Опишите технику приготовления простых питательных сред.

5.5. В чем отличие экзотоксинов от эндотоксинов, какова их биологическая роль.

Литература:

1. Учебник Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; - Минск: РИПО, 2017» стр. стр.187-204, стр. 223-236.

2. Электронный образовательный ресурс: Эпизоотология goreglad.blogspot.com.