

Основные методы работы в области микробиологии



Биология

Микробиология и генетика

Основы микробиологии

Прикладные науки

Медицина

Гистология и медицинская микробиология



Уровень сложности

твёрдый



Размер группы

2



Время подготовки

30 Минут



Время выполнения

45+ Минут

PHYWE
excellence in science

Информация для учителей

Описание

PHYWE
excellence in science

Экспериментальная установка

История микроорганизмов начинается с изобретения микроскопа на заре 17 века. После этого Луи Пастер установил первые важные методы работы с бактериями. Роберт Кох сделал микробиологию более доступной в медицине. Его методы лежат в основе современной микробиологической работы, например, использование агара.

Этот эксперимент предназначен для получения базовых знаний при работе с микроорганизмами.

Дополнительная информация для учителей (1/2)

PHYWE
excellence in science

предварительные знания



Чтобы предотвратить загрязнение питательных сред и культур микроорганизмами, которые прилипают к рабочему оборудованию, оборудование, питательные среды и питательные растворы необходимо стерилизовать.

Научный принцип



Питательная среда разливается в чашки либо из пробирок, где в одной пробирке содержится необходимое количество готовой среды для одной чашки Петри, либо из колб Эрленмейера, если необходимо приготовить большое количество чашек одновременно.

Дополнительная информация для учителей (2/2)

PHYWE
excellence in science

Цель обучения



Студенты должны получить знания об основных методах работы, характерных для микробиологической работы.

Студентам предстоит отработать следующие методы работы:

1. Стерилизация оборудования
2. Приготовление стандартного питательного агара для бактерий.
3. Приготовление стандартного питательного агара для плесени и дрожжей.
4. Приготовление стандартного питательного раствора для бактерий.
5. Приготовление наклонных пробирок с агаром.
6. Инокуляция микроорганизмов.

Задачи



Инструкции по технике безопасности

PHYWE
excellence in science

Для этого эксперимента применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.

PHYWE
excellence in science

Информация для студентов

Мотивация

PHYWE
excellence in science

История микроорганизмов начинается с изобретения микроскопа на заре 17 века. После этого Луи Пастер установил первые важные методы работы с бактериями. Роберт Кох сделал микробиологию более доступной в медицине. Его методы лежат в основе современной микробиологической работы, например, использование агара.

Этот эксперимент предназначен для получения базовых знаний при работе с микроорганизмами.

Задачи

PHYWE
excellence in science

Экспериментальная установка

Практикуйте следующие методы работы:

1. Стерилизация оборудования
2. Приготовление стандартного питательного агара для бактерий.
3. Приготовление стандартного питательного агара для плесени и дрожжей.
4. Приготовление стандартного питательного раствора для бактерий.
5. Приготовление наклонных пробирок с агаром.
6. Инокуляция микроорганизмов.

Оборудование

Позиция	Материал	Пункт No.	Количество
1	Портативные весы, OHAUS PS121, 300 г / 0,01 г	49241-93	1
2	Мензурка, высокая, 600 мл,	46029-00	1
3	Мерный цилиндр, 100 мл	36629-00	1
4	Треножник, кругл., d=140 мм, h=240 мм	33302-00	1
5	Предметные стекла, 76x26 мм, 50 шт.	64691-00	1
6	Градуированная пипетка, 10 мл	36600-00	2
7	Штатив для 12 пробирок, деревянный, d = 22 мм	37686-10	1
8	Колба Эрленмейера, узкогорлая, 500 мл	36121-00	2
9	Набор пробирок, 160x16 мм, лабораторное стекло	37656-10	1
10	Мясная вытяжка, 10 г	31521-03	1
11	Пептон, из мяса, 50 г	31708-05	1
12	Стерильные пробки для d=15 мм, 250 шт.	39266-00	1
13	Стерильные пробки для d=29мм, 100 шт.	39267-00	1
14	Шаровая пипетка	36592-00	1
15	Шпатель, двухсторонний, 150 мм	33460-00	1
16	Стеклянный стержень, l=300 мм	40485-05	1
17	Проволочная сетка с керамикой, 160x160 мм	33287-01	1
18	Тест-полоски для pH проб, 6.5-10, 100 шт.	30301-04	1
19	Горелка Бунзена, природный газ, с краном	32167-05	1
20	Газовые шланги безопасности, DVGW, 1м	39281-10	1
21	Гидроксид натрия, хлопья, 500 г	30157-50	1
22	Вода, дистиллирован., 5 л	31246-81	1
23	Агар-агар, порошок, 100 г	31083-10	1
24	Настольный автоклав с вкладышем	04431-93	1
25	Часовое стекло, d=60 мм	34570-00	1
26	Соляная кислота, прибл.5%, 250мл	30315-25	1
27	Пинцет, прямой, с тупыми концами, l=130 мм	64610-00	1
28	Шкаф сушильный, 32 л, 300 ° C, 230 В	49559-93	1
29	Этиловый спирт, абсолютный, 500 мл	30008-50	1
30	Чашка Петри, стекло	64705-00	1
31	Тест-полоски для pH проб, 4,0-7,0, 100 шт.	30301-03	1
32	Электронагревательная плита, 230 В	04025-93	1
33	Проволочная петля	64936-00	1

Подготовка (1/9) Стерилизация оборудования

PHYWE
excellence in science

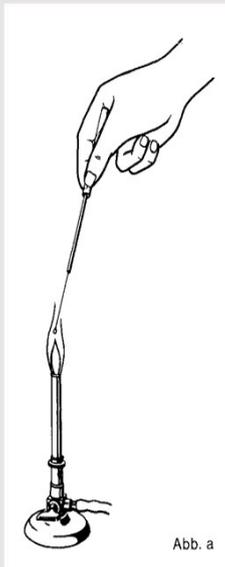


Abb. a

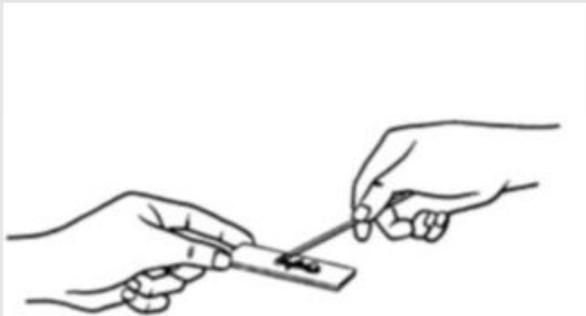
Оборудование должно быть стерильным, чтобы избежать загрязнения. Металлическое оборудование стерилизуется пламенем газовой горелки. До и после использования проволочные петли и иглы нагревают в пламени газовой горелки докрасна, а затем дают им остыть. Держатель также стерилизуют пламенем, если он может контактировать с культурами или любым стерильным оборудованием. Небольшие стеклянные предметы, такие как предметные стекла и покровные стекла, также стерилизуют пламенем. Перед обжигом их можно погрузить в 96% этиловый спирт. Во время этого процесса предметные и покровные стекла микроскопа необходимо удерживать с помощью пинцета. Пипетки стерилизуют, наполняя их два или три раза 96% -ным этиловым спиртом и давая спирту вытечь при продувке остатков этилового спирта в пламени газовой горелки, а затем повторно пропуская пипетку через пламя. Все остальные части оборудования из стекла нагреваются до 160 ° C в течение 1–1½ часа в стерилизаторе горячим воздухом. Риск разрушения и раскола ниже, поскольку они могут охлаждаться медленнее. Вот почему стеклянное оборудование всегда помещают в холодный стерилизатор, где его также оставляют охлаждаться после стерилизации.

Подготовка (2/9) Стандартная питательная среда для бактерий

Питательная среда создается для того, чтобы соответствовать требованиям, предъявляемым к организмам, в данном случае, бактериям. Используемый гелеобразующий агент представляет собой агар-агар или короткий агар. В отличие от желатина, агар может разлагаться несколькими видами бактерий. Взвесьте необходимые количества всех ингредиентов, перенесите их в мензурку и кипятите до полного растворения агара. Мензурка должна быть достаточно большой, чтобы вместить в четыре раза больше приготовленной питательной среды, потому что агар довольно легко вскипает. Как только раствор закипит, убавьте огонь и несколько раз перемешайте раствор. Взвесьте мясной экстракт. Для этого поместите его с помощью стеклянного стержня на предметном стекле микроскопа (изображение на следующем слайде) и слейте мясной экстракт в стакан. Предметное стекло микроскопа можно также прокипятить вместе с раствором и затем удалить.



Подготовка (3/9) Стандартная питательная среда для бактерий



Взвешивание мясного экстракта

В состав питательной среды должны входить: **мясной экстракт Либиха 0,3%; Пептон 0,5%; Агар 2,0%**; В качестве растворителя используется дистиллированная вода. Когда все ингредиенты полностью растворятся, питательную среду доводят до значения pH от 7,4 до 7,6 путем добавления капель 1% раствора гидроксида натрия. Значение pH проверяют с помощью тестовых палочек (pH 6,5–10,0). Бактерии лучше всего растут в нейтральной или слабощелочной среде, то есть при значении pH примерно от 7,0 до 7,2. Поскольку концентрация ионов водорода будет немного уменьшаться во время стерилизации питательной среды, ее с самого начала регулируют до более высокого уровня, чем фактически необходимый уровень. Подготовленную питательную среду разливают в пробирки; примерно от 12 до 15 мл (примерно наполовину) для заливки пластины.

Подготовка (4/9) Стандартная питательная среда для плесени и дрожжей



Слизь плесень

Плесень и дрожжи растут в основном на слабокислых субстратах, что необходимо учитывать при приготовлении питательных сред. В состав питательной среды должны входить: **сироп (свекольный сок) 5,0%; агар 2,0%**; в качестве растворителя используется дистиллированная вода. Заполните мензурку необходимыми количествами всех ингредиентов и действуйте аналогично бактериальной среде. Когда все ингредиенты растворятся, проверьте **значение pH** питательной среды с помощью тестовой палочки. Должно быть примерно **5,0-6,0**. Если значение pH отличается от эталонного значения, добавьте капли 1% раствора гидроксида натрия или 1% соляной кислоты. Подготовленную питательную среду разливают в пробирки; примерно от 12 до 15 мл (примерно наполовину) для заливки пластины и от 5 до 6 мл (примерно на четверть) для приготовления наклонных пробирок с агаром. Колбы Эрленмейера заполняются большими количествами, которые можно использовать за один раз для заливки пластин. Закройте пробирки и колбы Эрленмейера стерильными пробками и стерилизуйте их в автоклаве. Большинство дрожжей и плесени хорошо растут на такой питательной среде. Таким же образом приготовьте питательные среды с другим составом для дрожжей и плесневых грибов.

Подготовка (5/9) - Стерилизация питательной среды и растворов



Настольный автоклав

Компоненты питательных сред и растворов, а также инструменты и оборудование, необходимые для их приготовления, заражены широким спектром микроорганизмов, которые могут быстро расти и загрязнять приготовленные питательные среды. Чтобы удалить загрязнения, их помещают в автоклав и стерилизуют проточным паром. Стерилизаторы с горячим воздухом не подходят для питательных сред и растворов, поскольку в них будет снижено содержание воды, что приведет к увеличению концентрации питательных веществ.

Автоклавы - это пароварки, которые можно герметично закрыть. Они позволяют стерилизовать под избыточным давлением и при температуре выше 100 °C, тем самым убивая споры бактерий. Однако время стерилизации сильно зависит от насыщения паром в автоклаве.

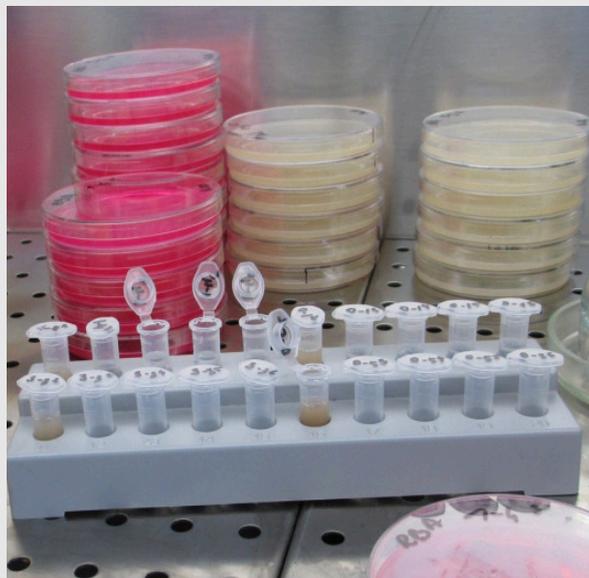
Подготовка (6/9) Стерилизация питательных сред и растворов



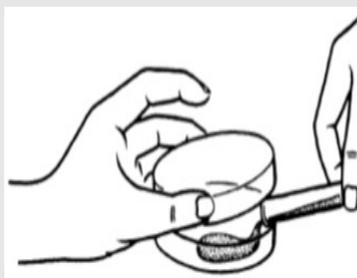
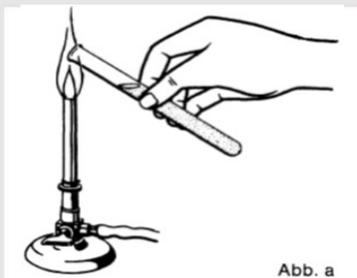
Вот почему необходимо следить за тем, чтобы после того, как вода в автоклаве закипела, выходило как можно больше воздуха для получения высокого уровня насыщения паром. Заполните автоклав необходимым количеством воды - как правило, сразу под вставкой - а затем добавьте предметы, которые необходимо стерилизовать. Поместите в контейнер несколько пробирок и установите условия стерилизации на 1,4 - 2,7 бар, прибл. 125–140 °C; после того, как вода в автоклаве закипит, на что указывает выход пара из клапана выпуска пара, оставьте клапан выпуска пара открытым еще 3 минуты, пока из автоклава не будет выпущен воздух, а затем закройте его. Теперь из-за повышения давления будет достигнуто рабочее давление, и пар будет выходить из клапана стерилизации. Это означает, что во время стерилизации должно выходить небольшое количество пара. После достижения высокого давления 1,4 бара продолжительность стерилизации составляет 20 минут или 15 минут при 2,7 бар. После стерилизации оставьте предметы в автоклаве, чтобы они остыли. Прежде чем открыть автоклав, подождите, пока не спадет высокое давление, чтобы гарантировать, что продукт стерилизации не выкипит из сосуда. А затем снимите крышку.

Подготовка (7/9) - Заливка пластин

Чашки Петри, наполненные застывшей питательной средой, называются пластинами. Питательная среда разливается в чашки либо из пробирок, в одной пробирке содержится необходимое количество готовой среды для одной чашки Петри. Пробирки с питательной средой микробиологи называют просто пробирками. Чтобы в любой момент можно было заливать чашки Петри, полезно иметь на складе пробирки с готовой питательной средой. Пробирки с питательным агаром кипятят на водяной бане до разжижения их содержимого. Пробирки с питательным желатином нагревают на водяной бане, пока желатин не станет жидким. После того, как питательная среда станет жидкой, вынимают одну пробирку из водяной бани и снимают ватную пробку. Затем ненадолго обжигают горловину трубки в пламени газовой горелки, чтобы удалить любые загрязнения (верхнее изображение на следующем слайде).



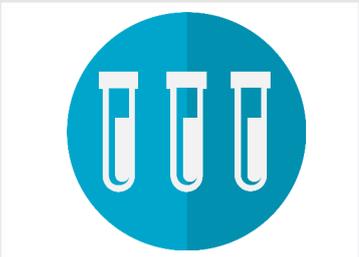
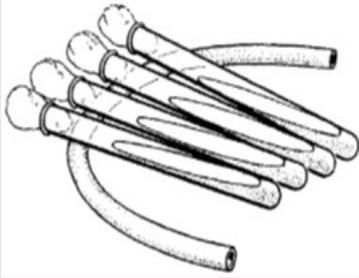
Подготовка (8/9) Стерилизация питательной среды и растворов



Откройте крышку стерильной чашки Петри диаметром 100 мм так, чтобы горлышко пробирки вошло между верхней и нижней частью, не касаясь их. Затем перелейте питательную среду из пробирки в чашку Петри (нижнее изображение) и немедленно закройте крышку. Во время заливки верхняя часть чашки Петри должна максимально полностью закрывать нижнюю часть, чтобы предотвратить попадание в чашку любых микроорганизмов из воздуха. Сделайте круговые движения закрытой чашкой Петри по столешнице, чтобы питательная среда равномерно распределилась по всей поверхности чашки. Затем дайте чашке отдохнуть, пока питательная среда не затвердеет.

Таким же образом поступают при заливке чашек Петри из колб Эрленмейера. Пластины, которые не используются сразу, можно в течение некоторого времени хранить в холодильнике крышкой вниз, то есть вверх дном.

Подготовка (9/9) Подготовка наклонных пробирок с агаром



Наклонные пробирки с агаром - это пробирки, в которых питательная среда затвердела с наклонной поверхностью. В результате для инокуляции становится доступным большее количество питательных веществ. Поскольку они довольно компактны, их часто используют вместо пластин в серии экспериментов. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов хранятся в наклонных пробирках с агаром для сбора, если это позволяют условия культивирования. Приготовьте желаемую питательную среду, налейте по 5-6 мл ее в несколько пробирок (примерно на четверть), закройте их стерильными пробками и стерилизуйте. Сразу после этого, пока питательная среда еще жидкая, поместите верхний конец пробирки на деревянную полоску высотой примерно 12-15 мм. Трубка газовой горелки также идеально подходит для этой цели, так как она имеет идеальный диаметр (верхнее левое изображение). В результате питательная среда затвердеет в пробирках и образует длинную наклонную поверхность. Питательная среда должна доходить примерно до начала верхней трети пробирки.

Выполнение работы (1/2)

При инокуляции микроорганизмов важно предотвратить загрязнение питательных сред или культур чужеродными микроорганизмами. Во время "посева" не ходите по комнате, чтобы избежать ненужного движения воздуха. Обожгите инокуляционную петлю в пламени газовой горелки, пока она не раскалится, чтобы очистить и стерилизовать ее. Затем дайте ей остыть. При извлечении микроорганизмов из пробирки осторожно извлеките ватную пробку из пробирки рукой, удерживающей петлю инокуляции. Удерживайте в этом положении (верхнее изображение на следующем слайде), пока она не будет снова вставлена в трубку. Обожгите открытое горлышко пробирки в пламени газовой горелки. Осторожно вставьте петлю инокуляционную в пробирку, вытащите немного культуры, еще раз обожгите горлышко пробирки и снова вставьте ватную пробку. Затем перенесите посевной материал на новую питательную среду или в нее.



Выполнение работы (2/2)



Если необходимо "засеять культурой" наклонную пробирку с агаром, откройте пробирку так же, как и в предыдущем случае. Во время перехода в питательные растворы масса микроорганизмов осторожно распределяется по стеклянной стенке чуть ниже поверхности жидкости, чтобы она распределилась в питательном растворе как можно более равномерно. Если необходимо инокулировать чашки Петри, они должны быть помещены крышкой вниз, то есть вверх дном. Затем следует поднять нижнюю часть, повернуть ее, распределить посевной материал и поместить нижнюю часть обратно на крышку. Таким же образом поступают при извлечении материала с чашки, на которой выросли микроорганизмы. На всех типах питательных сред посевной материал обычно распределяется зигзагообразно (верхнее изображение) для оптимального использования доступной поверхности питательных веществ. После инокуляции немедленно обожгите инокуляционную петлю в пламени газовой горелки, пока она не раскалится докрасна, чтобы очистить и стерилизовать ее.

PHYWE
excellence in science



Протокол

Задача 1

PHYWE
excellence in science

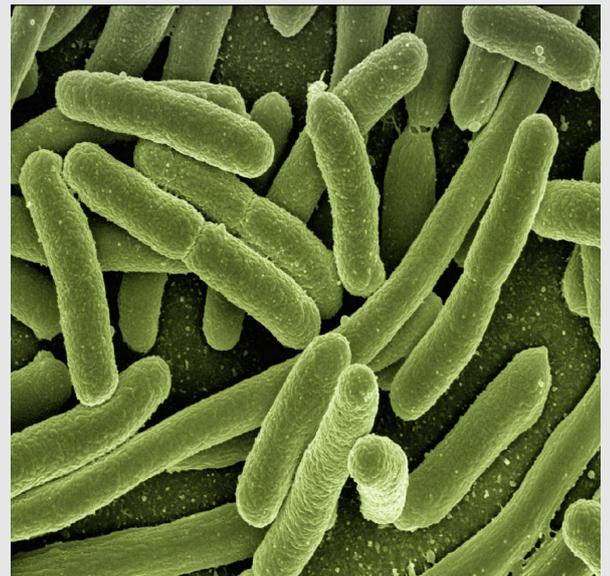
Что это за живое существо - плесень и дрожжи?



Задача 2

PHYWE
excellence in science

Какой части стандартных эукариотических клеток не хватает бактериям?

 Цитоплазма Митохондрия Ядро Клеточная мембрана Проверить

Задача 3

PHYWE
excellence in science

Почему вместо желатина используется агар?

Агар пористый и поэтому через него могут двигаться микроорганизмы.

Агар происходит из водорослей

В отличие от агара, желатин может быть переработан многими микроорганизмами.

Желатин разлагается при нагревании и после этого не затвердевает.



Слайд	Оценка/Всего
Слайд 22: Плесень и дрожжи	0/1
Слайд 23: Бактерии	0/2
Слайд 24: Агар-агар	0/1

Общий балл  0/4

 Показать решения

 Вспомнить