Практическое занятие № 2

Влияние разных режимов стерилизации на гибель микроорганизмов.

Цель работы: оценить эффективность термической и химической стерилизации на микроорганизмы.

Задачи работы:

1. Подвергнуть суспензию микроорганизмов термической и химической обработке.

2. Для каждого температурного режима и концентрации химического вещества рассчитать величину критерия стерилизации Δ и построить график зависимости от температуры и продолжительности обработки: Δ =*f* (*t* °C), Δ = *f* (τ, мин);

3. По полученным результатам сделать заключение о характере влияния стерилизующего фактора, механизме его действия на клетки микроорганизмов.

Методические указания

Ряд биотехнологических производств и отдельные стадии получения продукции с использованием биотехнологических приемов требуют обеспечения асептических условий.

Под **асептическими условиями** понимают мероприятия, препятствующие попаданию контаминантов.

Термином «*контаминанты*» обозначают постороннюю микрофлору, микроорганизмы-загрязнители.

Под поддержанием и созданием асептических условий в технологии следует понимать:

• обеспечение условий получения чистых культур в лаборатории и специализированных отделениях в растильных аппаратах, камерах;

• стерилизация, герметизация оборудования и коммуникаций;

• специальные приемы при введении добавок, посев, отбор проб;

• стерилизация пеногасителей, питательных сред, воздуха.

Под ***стерилизацией*** понимают полное освобождение любого материального потока, а также оборудования и коммуникации от жизнеспособных микроорганизмов, их спор.

Процессы, использование на практике которых, способствует достижению и поддержанию асептических условий, условно можно разделить на две группы: процессы, уничтожающие постороннюю микрофлору; процессы, удаляющие микроорганизмы из материального потока (рисунок 1).

При выборе метода стерилизации следует учитывать чувствительность микроорганизмов к применяемым факторам, а также их численность, видовую принадлежность, содержание в них влаги, физиологическую форму (вегетативная, споры), возраст клеток спор, значение pH, химический состав, физические свойства среды и ее объем.

Гибель микроорганизмов при стерилизации обусловлена повреждением биологически важных макромолекул клетки и, как следствие, нарушение определенных физиологических функций. Так, отмирание клеток при термообработке во влажной среде наступает из-за денатурации белков, и освобождения нуклеиновых кислот, инактивации ферментов, повреждения цитоплазматической мембраны. При воздействии на клетки сухого жара гибель происходит в результате активных окислительных процессов и нарушения клеточных структур.

Уничтожение микроорганизмов производят следующими физическими и химическими способами.

Пастеризация – это нагревание материала при температуре ниже 100 °С в течение 20 - 40 мин. При пастеризации погибают не все микроорганизмы, так некоторые термоустойчивые бактерии, а также споры остаются живыми. Поэтому пастеризованные продукты следует немедленно охлаждать до 4 - 8 °С и хранить в холоде, чтобы задержать прорастание спор и развитие сохранившихся клеток.

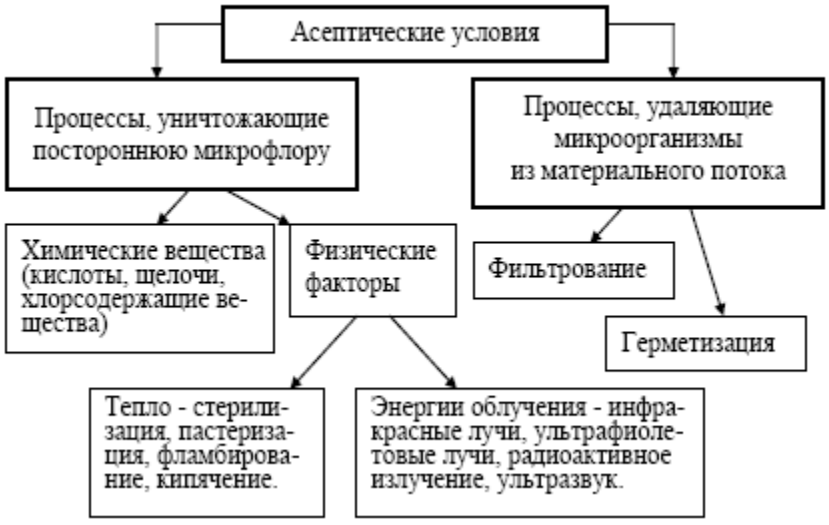

Рисунок 1 - Процессы создания асептических условий

Стерилизация – это термическая обработка при температурах выше 100 °С, в результате которой гибнут и вегетативные клетки и их споры.

Стерилизуют многие предметы и материалы в медицинской практике, питательные среды и оборудование в биотехнологическом производстве.

Воздействие на микроорганизмы различных форм **лучистой энергии**, представляющих собой электромагнитные колебания различной длины волн, проявляется по-разному и зависит от длины волны, дозы облучения. При облучении наиболее угнетаемыми в клетке процессами является окислительное фосфорилирование, изменяются физико-химические свойства нуклеопротеидов, происходят изменения в ДНК, нарушаются транскрипция, трансляция, функции мембран, угнетаются энергетические процессы. Возможны все виды мутаций: геномные – кратные изменения гаплоидного числа хромосом; хромосомные – структурные или численные изменения хромосом; генные или точковые – изменение молекулярной структуры генов, в результате синтезируются белки, утратившие свою биологическую активность.

Среди химических веществ можно выделить антисептики – вещества, губительно действующие на микроорганизмы (бактерицидные, фунгицидные) и задерживающие развитие (бактериостатические, фунгистатические). Эффективность действия антисептиков зависит от природы вещества, концентрации, биологических особенностей микроорганизмов, продолжительности воздействия, температуры, pH и состава среды. Более чувствительны к антисептикам вегетативные клетки, чем споры.

Из **неорганических соединений** сильнодействующими являются соли тяжелых металлов. Бактерицидное действие проявляют окислители Cl_2, I_2, H_2O_2, $KMnO_4$, H_2SO_4, HCl, H_2S, CO_2, SO_2.

Из **органических соединений** ядовиты для микроорганизмов фенолы, альдегиды, спирты, органические кислоты (салициловая, уксусная, бензойная, сорбиновая), эфирные масла, смолы, красители (генцианвиолет, фуксин, бриллиантовая зелень).

Механизм действия антисептиков различен:

• повреждение клеточной стенки и нарушение мембраны;

• нарушение обмена веществ в результате взаимодействия с компонентами клетки после проникновения в нее;

• воздействие на белки, ферменты;

• растворение липидов клеточных мембран;

• изменение pH среды.

Химические вещества используют для дезинфекции воды, тары, оборудования, инвентаря, как консерванты готовой продукции, сырья.

Применение антисептиков ограничено и строго нормируется по дозе, цели обработки, назначению продукции.

Ход работы

1. Готовим суспензию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и разливаем по пробиркам.

2. Пробирки с микробной суспензией выдерживаем при различных температурных режимах (65 °С, 85 °С, 100 °С). Через определенные интервалы времени (15 мин) в течение часа отбираем пробы и определяем количество живых клеток с помощью камеры Горяева после предварительной обработки микробной суспензии метиленовым синим. Живые клетки остаются прозрачными, а мертвые - окрашены в голубой или синий цвет.

3. Микробную суспензию обрабатываем различными концентрациями этанола (5%, 10%, 30%, 50% к объему среды). Через определенные интервалы времени отбираем пробы (15 мин) в течение часа и определяем количество живых клеток с помощью камеры Горяева.

Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева-Тома

Счетная камера Горяева-Тома представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками на части. Центральная часть стекла ниже боковых на 0.1 мм (глубина камеры) и на ней нанесена сетка (рисунок 2). Площадь большого квадрата равна 1/25 мм^2, площадь малого – 1/ 400 мм^2.

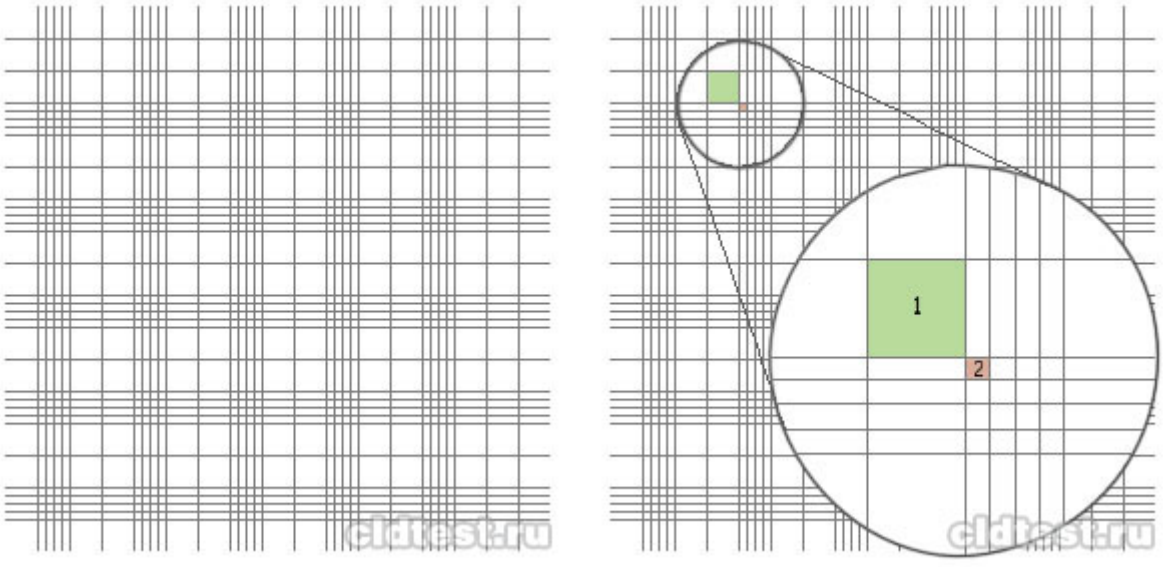

Рисунок 2 – Сетка камеры Горяева- Тома

.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Эти кольца указывают на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3 - 5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости. Число клеток подсчитывают с объективом 8х или 40х. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600. Подсчет клеток повторяют 3 - 4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры.

4. Вычислить число живых клеток в 1 мл суспензии по формуле:

$$M = a \cdot 1000 \cdot n / h \cdot S,$$

где M- число клеток в 1 мл суспензии;

a - среднее число клеток в 1 квадрате сетки;

h - высота камеры, мм;

S - площадь 1 квадрата сетки, мм^2;

n - коэффициент разведения суспензии

5. Построить графическую зависимость $M = f(\tau)$ жизнеспособности клеток от продолжительности их обработки определенным фактором (τ). Проанализировать кинетику гибели микробных клеток во временных интервалах от 0 до 30 минут и от 30 до 60 минут.

6. Для каждого температурного режима и концентрации химического вещества рассчитать величину критерия стерилизации, определяемый как натуральный логарифм отношения жизнеспособных клеток после обработки к исходному количеству клеток.

7. По полученным результатам сделать развернутое заключение о характере влияния стерилизующего фактора, механизме его действия на клетки микроорганизмов.

.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под асептикой?
2. Какие факторы внешней среды могут оказывать бактерицидное действие?
3. От каких параметров зависит интенсивность губительного воздействия?
4. Каковы причины гибели клеток микроорганизмов при воздействии высоких температур, излучения химических соединений?
5. Чем отличается пастеризация от стерилизации?
6. Какие химические вещества используют для обеспечения асептических условий?