25.01.23.

05 група

Методи мікробіологічних досліджень.

Л.П.Р.

Тема: правила роботи в мікробіологічній лабораторії

Мета роботи: вивчення загальних правил роботи в мікробіологічній лабораторії та ознайомлення з матеріалами і устаткуванням мікробіологічної лабораторії

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Мікробіологічна лабораторія. Приміщення лабораторії

Залежно від призначення мікробіологічна лабораторія (учбова, виробнича, науково-дослідна) складається з декількох приміщень: кімнати для проведення мікроскопічних робіт, біохімічної лабораторії, кімнат стерилізації, мийної і термостатної. Всі приміщення повинні бути сухими, світлими, добре вентильованими, мати підведення газу, гарячої і холодної води і пристрій для її відведення.

Приміщення для основної мікробіологічної роботи повинне бути повернуто вікнами на північ або північний захід, оскільки для мікроскопування потрібне рівне розсіяне світло. Пряме сонячне проміння стомлює зір, заважає мікроскопуванню, завдає шкоди оптичним приладам і мікроорганізмам. Природна освітленість робочого приміщення повинна відповідати світловому коефіцієнту 1:5. Стіни кімнати зафарбовують масляною фарбою світлих тонів. Підлогу покривають лінолеумом або плитами, що легко миються, із шлакосіталу. Столи для мікроскопування розташовують так, щоб світло падало, спереду або збоку, краще з лівого боку. Висота столів повинна бути не більше 0,7 м. Поверхню столів покривають пластиком або лінолеумом, що полегшує їх миття і дезинфекцію. Столи забезпечують зручними для роботи гвинтовими табуретами.

В приміщенні мікробіологічної лабораторії двічі в день проводять вологе прибирання. Підлогу, стіни і меблі періодично обробляють пилососом і протирають дезинфікуючими розчинами: 2–3 % розчином соди (двовуглекислого натрію), 3–5 % розчином фенолу або лізолу (препарат фенолу з додаванням зеленого мила), 0,5–3 % розчином хлораміну, 0,3–0,4 % розчинами четвертинних аммонійних сполук. Два-три рази на місяць, особливо після роботи з міцеліальними грибами, для знищення мікроорганізмів в повітрі і на різних поверхнях приміщення лабораторії

піддають спеціальній обробці – опромінюванню переносними бактерицидними лампами (БУФ-15 або БУФ-30) тривалістю від 30 хвилин до декількох годин.

Деякі роботи з мікроорганізмами, що вимагають абсолютної стерильності (пересівання чистих культур, виділення і ін.), проводять в спеціальному ізольованому приміщенні – боксі площею 3–5 м^2. Бокс розділяють на дві частини: робоче приміщення і предбоксник, що виключає різку циркуляцію повітря і занесення мікроорганізмів ззовні. В боксі встановлюють стіл, стільці, газові пальники, підвішують або укріплюють на кронштейні, що висувається, бактерицидні лампи. Приміщення боксу періодично миють і дезинфікують, а після прибирання і перед роботою протягом 30–60 хвилин опромінюють бактерицидними лампами, що розміщені на висоті 2 м від підлоги.

Біохімічна лабораторія обладнана хімічними столами, витяжними шафами, необхідними приладами (фотоелектроколориметрами, спектрофотометром, рН-метрами, технічними і аналітичними терезами, холодильниками, вакуумом-насос і т. д.), шафами з посудом і хімічними реактивами.

В препараторскій встановлюють робочі столи, шафи з інструментами, стерильним посудом і реактивами, центрифуги і інші вібруючі апарати, холодильники для зберігання препаратів і чистих культур, термостати. В кімнаті стерилізації розміщають автоклави для стерилізації живильних середовищ і посуду, окремий автоклав для термічної обробки використаного лабораторного посуду (колби, пробірки, піпетки, що містять живі мікроорганізми), кип’ятильники Коха, сушильні шафи, стерилізатори інструментів.

Мийну обладнують зручними раковинами (або ваннами) з підведенням гарячої і холодної води, стелажами для сушіння посуду, газовими або електричними плитами і посудом для варіння живильних середовищ, терезами, дистиляторами води.

В термостатній кімнаті, температура в якій повинна бути в межах 30-45°С, розміщують стелажі для засіваючих колб і пробірок, на спеціальних фундаментах встановлюють ротаційні гойдалки. Розроблені конструкції гойдалок, підвішених до металевих рам.

В учбовій лабораторії за кожним студентом закріплюють постійне робоче місце і прилади. На лабораторному столі встановлюють освітлювач для мікроскопа, спиртовий або газовий пальник, набір барвників, бактеріологічні петлі і голки, штатив для пробірок, градуйовані і пастерівські піпетки, скляні шпателі, предметні скельця – звичайні і з поглибленням, покривні скельця, скляний місток і ванну для зафарбовування препаратів, промивалку з водою, дезинфікуючу рідину, банку з ватою, фланелеву (марлеву) серветку, олівець по склу, іммерсійну олію, пісочний годинник, фільтрувальний папір, нарізаний за розміром предметного скла, сірники. Мікроскоп розміщують на столі, покривають скляним ковпаком або поліетиленовим чохлом або зберігають в підвісному ящику під кришкою

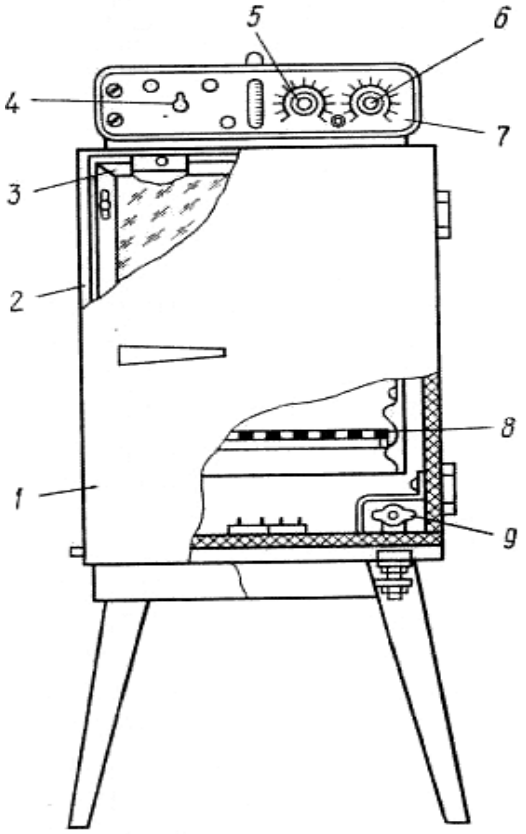
столу. Робоче місце повинно бути в найстрогішій чистоті. Поверхню столу протирають ватяними тампонами, змоченими лізолом, хлораміном, 70 % (за об'ємом) етанолом або ізопропанолом. Спирти можуть бути використані і для дезинфекції рук.

Апарати, прилади, посуд, матеріали, інвентар

Апарати і прилади. Термостати повітряні (рисунок 1.1), водяні призначені для вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах при постійній заданій температурі. В лабораторії встановлюють декілька термостатів з різною температурою, сприятливою для розвитку окремих груп мікроорганізмів: мезофілів – 28-30°С, термофілів – 43-55°С, патогенних видів – 37°С.

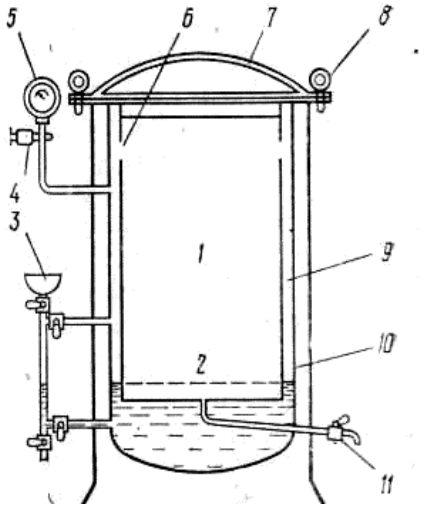
Термостати бувають різної форми, розмірів і конструкцій: від невеликої шафки до політермостату з декількома відділеннями або окремої термостатної кімнати.

Автоклави слугують для стерилізації посуду, живильних середовищ і інших матеріалів насиченою парою під тиском вище атмосферного. Автоклави бувають різних конструкцій (вертикальні, горизонтальні), але принципова схема їх будови однакова (рисунок 1.2).



1 – двері зовнішні; 2 – корпус; 3 – двері внутрішні; 4 – тумблер для включення термостата в мережу; 5 – потенціометр для точної установки температури; 6 – потенціометр для грубої установки температури; 7 – блок управління; 8 – полиці; 9 – елемент нагрівальний

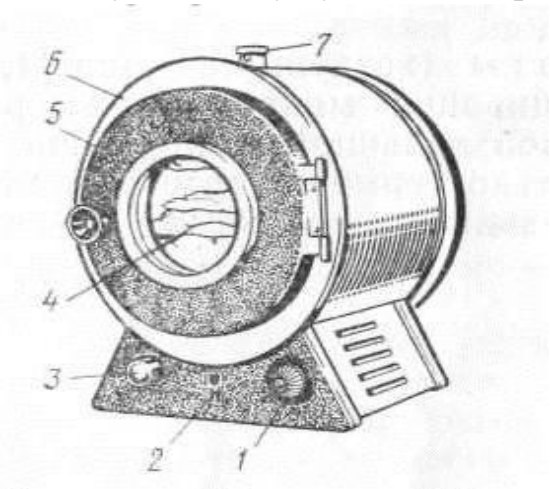
Рисунок 1.1 – Повітряний електричний термостат



1 – камера стерилізації; 2 – підставка для розміщення матеріалів, що стерелізуються; 3 – лійка для заповнення автоклава водою;4 – клапан запобіжний; 5 – манометр; 6 – отвір для надходження пари в камеру стерилізації; 7 – кришка; 8 – затиски гвинтові; 9 – камера водопарова; 10 – казан; 11 – кран для спуску води

Рисунок 1.2 – Схема будови автоклава

Сушильна шафа (рисунок 1.3) з терморегулятором призначена для сушки і стерилізації лабораторного посуду, для висушування різних матеріалів до постійної маси. Сушильну шафу виготовляють з термостійких матеріалів (металу і азбесту) і розраховують на діапазон температур в робочій камері від 40 до 200^{0}С. Тривалість розігрівання до граничної температури близько 1,5 год. Всередині шафа обладнана полицями з дірчастих листів металу, на яких розміщують посуд або висушуваний матеріал.



1 – рукоятка терморегулятора з шкалою; 2 – вимикач приладу; 3 – лампа сигнальна; 4 – підставка; 5 – дверцята; 5 – корпус; 7 – отвір для термометра і вентиляційний ковпачок

Рисунок 1.3 – Сушильна шафа:

Холодильник використовують для зберігання при температурі близько +4°С музейних і робочих культур мікроорганізмів, живильних середовищ, деяких реактивів і розчинів.

Центрифуга призначена для розділення рідких і твердих фаз суспензій. Центрифуга забезпечена двома роторами, які поперемінно, насаджуються на вал електродвигуна: ротором-хрестовиною з чотирма стаканами і ротором кутового типу з гніздами для скляних або поліетиленових пробірок. Швидкість обертання роторів від 3000 до 6000 об/хв.

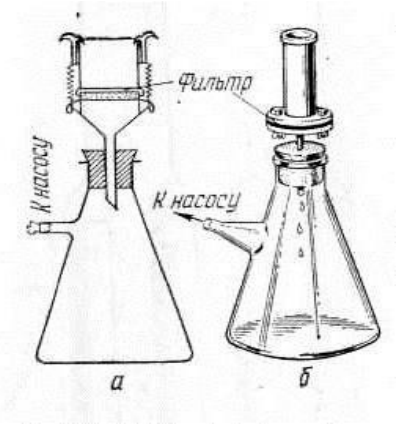
Лабораторний pH-метр призначений для вимірювання активності іонів водню (pH) і окислювально-відновного потенціалу (Eh).

Рефрактометр використовують для визначення вмісту сухих речовин, цукрів, спиртів, амінокислот, вітамінів, екстрактних речовин. Шкала показує показник заломлення розчину і вміст сухих речовин в %.

Фотоелектроколориметр застосовують для вимірювання оптичної густини і коефіцієнтів пропускання забарвлених і колоїдних розчинів. Прилад забезпечують набором світлофільтрів в області спектру 315–630 нм. Колориметр-нефелометр дозволяє оцінювати за мірою каламутності розчинів концентрацію клітин мікроорганізмів.

Спектрофотометр використовують для вимірювання оптичної густини і коефіцієнтів пропускання рідких і твердих речовин. Можна вивчати спектри поглинання у видимій (400–760 нм) області спектру.

Фільтри Зейтца є дисками завтовшки 3–5 мм і діаметром 33–140 мм, виготовлені з суміші азбесту і целюлози. Із збільшенням вмісту целюлози пористість фільтру зростає. Випускаються фільтри марки Ф2 і СФ (стерилізуючі). Фільтри вставляються у лійку (рисунок 1.4), як правило, з нікельованого металу. Лійка складається з двох частин: верхньої циліндрової і нижньої конусоподібної, між якими на металевій сітці укладають азбестовий фільтр. Потім лійку загвинчують або туго затискають спеціальними гвинтами, а вузький тубус вставляють в гумову пробку колби

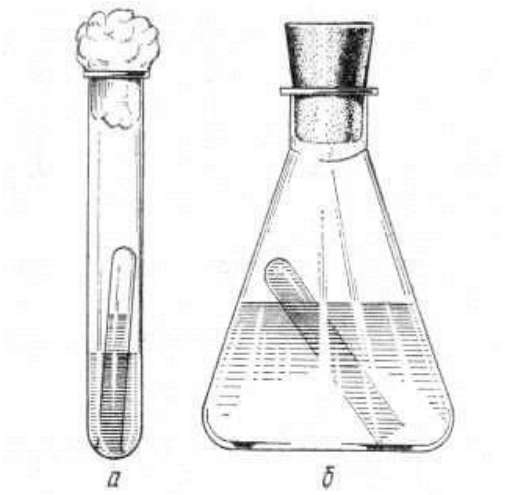


Бунзена.

а – зі скляним утримувачем; *б* – з металевим утримувачем

Рисунок 1.4 – Фільтри Зейтца

Посуд. Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд. Чашки Петрі (діаметр 10 см, висота 1,5 см) застосовують для виділення чистих культур, кількісного обліку мікроорганізмів, аналізу мікрофлори на щільних живильних середовищах і інших досліджень; колби Виноградського, плоскі бутлі-матраци, качалочні колби для вирощування мікроорганізмів аеробів, пробірки і колби з поплавцями (рисунок 1.5) – для вивчення процесів бродіння.

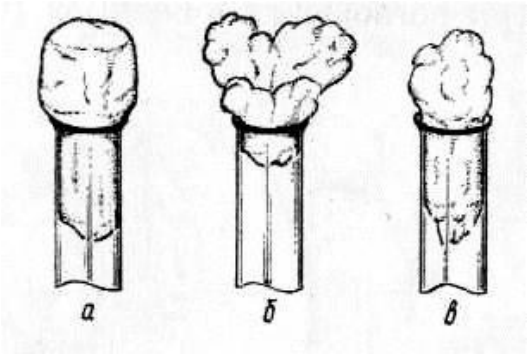


а – пробірка; б – колба з поплавцями

Рисунок 1.5 – Скляний посуд для вивчення процесів бродіння

Окрім спеціального мікробіологічного посуду широко використовують звичайний хімічний посуд: колби плоскодонні конічні Ерленмейера, круглодонні, мірні (на 25, 50, 100, 200 мл); піпетки градуйовані (на 1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора (на 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 мл), пастерівські піпетки з відтягнутим капіляром, пробірки біологічні (без ранта) 18×2,0; 18×1,5; 15×1,5 см; бюретки, крапельниці, лійки, мензурки, циліндри, бюкси, склянки.

Приготування ватяних пробок. Колби і пробірки, що використовуються для приготування і стерилізації живильних середовищ і вирощування культур мікроорганізмів, закривають ватяними пробками (рисунок 1.6). Пробки виготовляють вручну або за допомогою спеціальної машини.



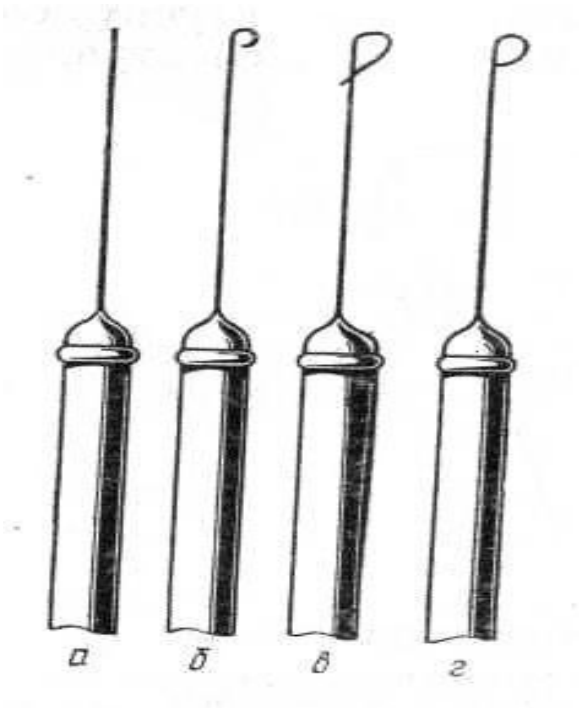
а – правильно; б і в – неправильно

Рисунок 1.6 – Приготування ватяних пробок:

Правильно виготовлена пробка повинна мати довжину 3–4 см, помірно туго входити в пробірку, бути щільною і не міняти своєї форми при багатократному застосуванні. Ватяна пробка краще зберігається, якщо її обгорнути шматочком марлі, кінці якої у верхній частині щільно зав'язати ниткою.

Інвентар. В мікробіологічній практиці застосовують петлі, голки, пінцети, ножиці, свердла для пробок, металеві циліндри для піпеток, дротяні або металеві з отворами корзини для стерилізації пробірок, пластмасові або металеві штативи для пробірок і ін.

Петлі і голки виготовляють з платинового, нікелевого або хромонікелевого дроту завдовжки 8 см, діаметром 0,4–0,5 мм і упаюють в скляні або металеві утримувачі. Вільний кінець дроту акуратно загинають у вигляді петлі з щільно притиснутим кінцем (рисунок 1.7), інакше рідина в кільці не утримуватиметься.



а – голка для посівів; б , в – петлі виконані неправильно; г – петля виконана правильно

Рисунок 1.7 – Петлі і голки

Правила роботи в мікробіологічній лабораторії

В мікробіологічній лабораторії суворо дотримуються правил і підтримують певний режим. Працюють в білих халатах, шапочках або косинках. На робочому місці не повинно бути зайвих предметів. Все обладнання розташовують на певних місцях. Пробірки і колби з культурами мікроорганізмів повинні мати чіткі написи чорнилом по склу, ємності з реактивами і розчинами – етикетки. При роботі із спиртівками остерігаються запалювання пари спирту. Не можна запалювати спиртівку від іншої спиртівки, що горить. Гасять полум'я спиртівки тільки спеціальними

ковпачками. При запалюванні ватяних пробок на них не дмухають, оскільки це підсилює горіння. Для попередження доступу повітря пробки, що горять, вводять в пробірки, колби або накривають зверху рушником.

До і після роботи ретельно миють дезинфікують поверхню столу, на якому проводиться дослідження мікроорганізмів. Мікробна маса не повинна забруднювати руки стіл і навколишні предмети. Петлі, голки, пінцети після кожного зіткнення з мікроорганізмами пропалюють в полум'ї спиртівки або газового пальника і ставлять в спеціальний штатив. Мікробну суспензію, що пролилася, знешкоджують, використовуючи дезинфікуючі засоби.

Після закінчення роботи забруднений мікроорганізмами посуд негайно стерилізують кип'ятінням або автоклавуванням, щоб знищити живі клітини і лише після цього можна мити. Поверхню твердих середовищ з мікробами заливають дезинфікуючим розчином. Через добу середовища можна викидати і мити посуд. Використані піпетки кладують в 3% розчин хлораміну, після чого миють і стерилізують. Предметні і покривні скельця, після роботи кладуть в дезинфікуючий розчин, потім ретельно миють в проточній воді. Посуд миють тільки в гумових рукавичках. Неакуратне поводження з мікроорганізмами може привести до утворення в повітрі мікробного аерозолю. При роботі з бактерицидними лампами користуються темними або простими захисними окулярами. Не можна дивитися на світло лампи незахищеними очима, оскільки це може привести до втрати зору.

Суворого дотримання правил безпеки вимагає поводження з апаратами, що працюють під тиском, напругою або при високій температурі.

В лабораторії не дозволяється палити, пити, багато ходити, вносити в неї сторонні предмети. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторного приміщення.

Слід суворо дотримуватися особистої гігієни – ретельно дезінфікувати і мити руки з милом після закінчення роботи і перед їжею.

В спеціальному журналі студенти і співробітники роблять запис про проведення інструктажу і ознайомлення з режимом роботи в лабораторії.

Правила для студентів при роботі в мікробіологічний лабораторії

1. Кожний студент має в лабораторії постійне місце роботи та закріплений за ним мікроскоп і працює індивідуально.
2. На лабораторному столі не повинно бути зайвих предметів (у тому числі портфелів, сумок, головних уборів тощо).
3. Студенти повинні працювати в чистих халатах, волосся у студенток має бути підібраним і не спадати на плечі.
4. У лабораторії заборонено вживання їжі, куріння, зайве ходіння.
5. Під час роботи з культурами мікроорганізмів необхідно виконувати всі правила мікробіологічної техніки. Запалювати спиртівки виключно сірниками. На пробірках, чашках Петрі треба відмічати прізвище студента, номер групи, дату, розведення тощо.

6. Усі предмети, які використовувалися під час роботи з живими культурами мають бути знезаражені над полум’ям спиртівки (петлі, голки)

або занурені в дезінфікуючий розчин (предметні скельця, піпетки, шпателі тощо).

7. Наприкінці заняття студент повинен привести до порядку робоче місце, вимити руки.

Кожний студент веде журнал лабораторних робіт, який є документом, що дозволяє контролювати правильність отриманих даних.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Завдання **1** ***Вивчити приміщення і устаткування мікробіологічної лабораторії***

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть основні приміщення мікробіологічної лабораторії і розташоване в ньому устаткування. Результати оформити у вигляді таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Характеристика приміщень і устаткування в ньому

№ п/п	Назва приміщення	Види устаткування

Завдання 2 Вивчити правила роботи в мікробіологічній лабораторії

Використовуючи дані теоретичної частини, вивчіть правила роботи в мікробіологічній лабораторії. Результати оформити в довільній формі