

Міністерство освіти і науки України
Департамент освіти і науки Полтавської обласної державної адміністрації
Професійно-технічне училище №32 м.Червонозаводське

ВИРОБНИЧЕ НАВЧАННЯ

збірник конспектів

Майстер виробничого навчання
Ястреба І.О.

15

ЗМІСТ

№ уроку	Назва теми	Сторінка
	ВСТУП	
1	Вступ	4
	ІНСТРУКТАЖ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ, ПОЖЕЖНОЇ БЕЗПЕКИ І ЕЛЕКТРОБЕЗПЕКИ	
2	Інструктаж з техніки безпеки, пожежної безпеки і електробезпеки	6
	ВИКОНАННЯ РОБІТ У ХІМІКОБАКТЕРІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	
3	Обладнання та посуд для хіміко-бактеріологічних досліджень	13
4	Вивчення прийомів роботи з оптичним мікроскопом	19
5	Освоєння техніки приготування поживних середовищ	23
6	Освоєння техніки посіву культур мікроорганізмів на різні поживні середовища	27
7	Техніка посівів бактеріологічних препаратів у чашки Петрі	30
8	Методи ідентифікації мікроорганізмів	33
9	Кількісний облік мікроорганізмів	36
	Список використаної літератури	39

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Збірник призначений для учнів ПТУ №32 м.Червонозаводське, які навчаються за професією «Лаборант ХБА», кваліфікація 3 розряд.

У результаті вивчення дисципліни

УЧЕНЬ ПОВИНЕН ЗНАТИ:

- ◆ основи хімії і елементарні основи бактеріології в межах виконуваної роботи;
- ◆ вимоги державних стандартів до проведення хіміко-бактеріологічних аналізів;
- ◆ порядок відбирання зразків та їх підготовки до випробувань;
- ◆ необхідний обсяг випробувань;
- ◆ способи приготування робочих і титрованих розчинів, стерилізації бактеріологічних середовищ;
- ◆ систему записів результатів випробувань і методи їх статистичного опрацювання.

УЧЕНЬ ПОВИНЕН УМІТИ:

- ◆ проводити різноманітні хіміко-бактеріологічні аналізи води, харчових продуктів, сировини, напівфабрикатів і готових виробів за затвердженими методиками.
- ◆ визначати кислотність, густину вмісту жирових вуглецевих речовин, солей тощо, капілярність, наявність хлористих, сірчаноокислих і кальцієвих солей, вміст жирових і воскоподібних речовин, тощо.
- ◆ вести контрольно-облікові записи.

Тема 1. ВСТУП

Урок 1. Вступ

План

1. Ознайомлення з програмою виробничого навчання і видами робіт, які виконує лаборант ХБА 3 розряду

1. Ознайомлення з програмою виробничого навчання і видами робіт, які виконує лаборант ХБА 3 розряду

Лаборант ХБА 3 розряду повинен знати: основи хімії і елементарні основи бактеріології в межах виконуваної роботи; вимоги державних стандартів до проведення хіміко-бактеріологічних аналізів; порядок відбирання зразків та їх підготовки до випробувань; необхідний обсяг випробувань; способи приготування робочих і титрованих розчинів, стерилізації бактеріологічних середовищ; систему записів результатів випробувань і методи їх статистичного опрацювання; матеріали теоретичних знань зі спеціальної технології, основ мікробіології, охорони праці, електротехніки, інформаційних технологій, основ галузевої економіки і підприємництва, основ правових знань.

Лаборант ХБА 3 розряду повинен уміти: проводити різноманітні хіміко-бактеріологічні аналізи води, харчових продуктів, сировини, напівфабрикатів і готових виробів за затвердженими методиками. Визначати кислотність, густину вмісту жирових вуглецевих речовин, солей тощо, капілярність, наявність хлористих, сірчаноокислих і кальцієвих солей, вміст жирових і воскоподібних речовин, тощо. Вести контрольно-облікові записи.

Загальнопрофесійні вимоги

Повинен:

- а) раціонально та ефективно організовувати працю на робочому місці;
- б) дотримуватися норм технологічного процесу;
- в) не допускати браку в роботі;

г) знати і виконувати вимоги нормативних актів про охорону праці й навколишнього середовища, додержуватись норм, методів і прийомів безпечного ведення робіт;

д) використовувати в разі необхідності засоби попередження і усунення природних і непередбачених негативних явищ (пожежі, аварії, повені тощо);

є) знати інформаційні технології.

Вимоги до освітньо-кваліфікаційного рівня осіб, які навчатимуться в системі професійно-технічної освіти

Попередній освітньо-кваліфікаційний рівень — “Лаборант хіміко-бактеріологічного аналізу” 2-го розряду:

- ◆ за умови продовження первинної професійної підготовки в професійно-технічних навчальних закладах першого, другого та третього атестаційних рівнів без вимог до стажу роботи;
- ◆ за умови підвищення кваліфікації, стаж роботи за професією 2-го розряду не менше 1 року.

Сфера професійного використання випускника: дослідження та визначення хіміко-бактеріологічного аналізу води, харчових продуктів, сировини, напівфабрикатів та іншої продукції, що виробляється в галузях сільського господарства та промисловості .

Заняття для самоперевірки:

1. Що повинен знати лаборант ХБА 3 розряду?
2. Що повинен уміти лаборант ХБА 3 розряду?
3. Назвіть загальнопрофесійні вимоги до лаборанта 3 розряду
4. Які вимоги до освітньо-кваліфікаційного рівня осіб, які навчатимуться в системі професійно-технічної освіти ?
5. Перелічіть сферу професійного використання випускника

Тема 2. ІНСТРУКТАЖ З БЕЗПЕКИ ПРАЦІ, ПОЖЕЖНОЇ БЕЗПЕКИ І ЕЛЕКТРОБЕЗПЕКИ

Урок 2. Інструктаж з безпеки праці, пожежної безпеки і електробезпеки.

1. Загальні правила роботи в хімічній лабораторії
2. Робота зі шкідливими отруйними та вогненебезпечними речовинами
3. Пожежна безпека
4. Медична допомога
5. Засоби індивідуального захисту

1. Загальні правила роботи в хімічній лабораторії

До роботи в хімічній лабораторії допускаються тільки ті особи, які пройшли повний інструктаж по техніці безпеки і вивчили безпечні методи роботи. Для роботи в хімічній лабораторії необхідно вивчити властивості тих хімічних речовин, з якими лаборант буде працювати, поведження із шкідливими речовинами та засоби профілактики отруєнь і першої допомоги, протипожежні засоби і правила користування ними.

Відповідальною за дотримання техніки безпеки і охорону праці в лабораторії являється завідувача лабораторією, яка розробляє інструкцію по техніці безпеки і вимагає її дотримання.

При роботі у лабораторії:

1. Робоче місце необхідно утримувати чистим, впорядкованим і дотримуватись тиші.
2. До початку роботи підготувати робоче місце, перевірити якість реактивів, справність приладів та обладнання.

3. На робочому місці забороняється тримати сторонні предмети що не пов'язані з проведенням аналізу.
4. Працювати в лабораторії необхідно в чистому білому халаті .
5. Категорично забороняється використовувати хімічний посуд для пиття води та приймання їжі.
6. При виконанні аналізів використовувати посуд у відповідності з методикою.
7. Реактиви, які поступають в лабораторію повинні мати етикетки на яких вказано: назва реактиву, хімічна формула, вага, ДЕСТ, характеристика, дата виготовлення, термін придатності.
8. Реактиви без етикеток не можна зберігати та застосовувати для аналізу.
9. Реактиви повинні знаходитись на відповідних місцях в певній послідовності.

При користуванні реактивами необхідно дотримуватись особливої акуратності, посуд з сухими реактивами і розчинами держати закритими. Закриваючи, не плутати пробок, в протилежному випадку реактиви забруднюються і стають непридатними для використання.

Скляний посуд з розчинами тримати так, щоб етикетка завжди знаходилась зверху і розчин не потрапляв на неї (при взятті з посудини), при цьому пробку необхідно тримати в руці або класти на стіл так, щоб частина пробки, яка входила в горло посудини не торкалась столу.

Папір, фільтри, побите скло та інші речовини, використані при аналізі, необхідно помістити в спеціальну посудину.

Особливої уваги потребує скло. Хімічний посуд і прилади з тонкого скла легко б'ються, при необережному поводженні з ним можна порізатись. Щоб уникнути травм, не можна різко ставити хімічний посуд на стіл. Неправильне охолодження або нагрівання скляних виробів, особливо товстостінних, може викликати тріщини. При перенесенні гарячого посуду необхідно користуватися затискачами, рушником.

По закінченні проведення аналізу необхідно привести в порядок робоче місце, прилади та обладнання. По закінченні роботи з концентрованими кислотами та лугами необхідно посуд нейтралізувати, а потім приступити до миття та сушіння посуду.

Необхідно завжди пам'ятати, що надійність роботи приладів і термін їх експлуатації залежить від правильного користування.

1. Рідкі кислоти можуть завдавати тяжких опіків, які погано загоюються, тому бутлі, призначені для зберігання винні бути в плетеному кошику.
2. Бутиль без обплетення забороняється ставити на підлогу, особливо кам'яну.
3. Не можна переносити великі бутлі з хімічними речовинами і переливати їх одній людині.
4. Необхідно пам'ятати, що при розведенні концентрованих кислот (особливо сірчаної і азотної) кислоту доливають до води, а не навпаки, тому що в протилежному разі вода закипить і кислота почне розбрискуватись.
5. Операції з отруйними і їдкими речовинами можна проводити тільки під тягою.
6. При подрібненні їдких лугів слід працювати у захисних окулярах
7. Шматки твердого лугу можна брати тільки в гумових рукавицях або тигельними щипцями. При потраплянні на шкіру розчинів лугу уражене місце промивають розведеною кислотою, краще оцтовою, а потім водою.
8. Оскільки при розчиненні їдких лугів відбувається сильний розігрів, розчиняти їх у товстостінному скляному посуді не рекомендується.
9. Не можна набирати піпетками розчини кислот, лугів та інших шкідливих речовин ротом. Щоб запобігти опіків і отруєння, використовують гумові рукавиці.

2. Робота зі шкідливими отруйними та вогнєнебезпечними речовинами

Отруйні та шкідливі речовини можуть бути: токсини, які виділяють деякі мікроорганізми, медикаменти (снотворні та заспокійливі засоби), побутові хімічні реактиви (лаки, метиловий спирт), (хімікати, миш'як, ртуть та інші сполуки).

Шкідливі отруйні речовини можуть бути газоподібні, рідкі, тверді, з цими речовинами необхідно працювати під витяжною шафою при включеній тязі в непошкоджених рукавицях.

Якщо отруйна речовина потрапила на шкіру, то її видаляють ватним тампоном, вмоченим в органічний розчинник не розмазуючи розчинник по шкірі, тверду отруйну речовину з одягу зчищають щіткою, під витяжною шафою, а рідкі – виводять пастою. Цю пасту накладають на пошкоджене місце, пляма висихає, а залишки зчищають і викидають у спеціально відведене місце.

Для відбору невеликих кількостей отруйних речовин застосовують спеціальні піпетки з балонами або піпетки з гумовою грушею. Забороняється набирати отруйні речовини в піпетку ротом.

Правила роботи:

1. Працювати під тягою.
2. Мати на поготові протигаз, окуляри , рукавиці.
3. Знати правила першої допомоги потерпілому та мати в лабораторії все необхідне для її надання .
4. Стежити, щоб отруйна речовина не потрапила на руки, обличчя, одяг.
5. Відбирати отруйні рідкі речовини спеціальними пристроями.
6. Перед зливанням отруйну речовину необхідно знешкодити.
7. Не можна залишати посуд з отруйними речовинами на столі.
8. Не допускається нагрівання отруйних речовин на відкритому полум'ї.
9. Зважування твердих отруйних речовин проводиться під тягою.
10. Не можна зберігати чи приймати їжу в лабораторії.
11. Тривалість роботи з шкідливими речовинами не повинно перевищувати 5 годин.
12. Не можна зберігати в одному приміщенні під тягою отруйні та хімічні речовини.
13. Зберігати вогнебезпечні речовини потрібно в ізольованих кімнатах.
14. Приміщення повинні бути обладнані вентиляцією .
15. В приміщенні забороняється палити

При виконанні бактеріологічних досліджень:

1. В лабораторії необхідно працювати спецодязі (халат, ковпак, спецвзуття).
2. Виходити за межі лабораторії заборонено.
3. При роботі не слід доторкатися руками до обличчя, користуватися носовою хустинкою.

4. Необхідно суворо дотримуватися заходів, що запобігають небезпеці зараження працюючих і викличуть можливість виносу збудників інфекції за межі робочого приміщення.
5. Необхідно тримати в окремому місці лабораторії резервний набір предметів для ліквідації наслідків можливої аварії.

3. Пожежна безпека

При проведенні практичних занять, пов'язаних з нагріванням, висушуванням аналізуючи речовин існує небезпека виникнення пожежі. Пожежі виникають через несправність електричних приладів, недотримання правил пожежної безпеки.

Правила пожежної безпеки вимагають регулярних перевірок електричних проводок у приміщеннях лабораторії, електричних кабелів, електричних запобіжників, а також щоденник профілактичних оглядів.

При нагріванні прилади слід підкладати товсті листи азбесту або заліза, а стіну біля електричних приладів необхідно оббити азбестом або залізом. Особливої уваги вимагають роботи з відкритим полум'ям, тому при роботі з масляними банями необхідно стежити за стабільністю температури.

При роботі з вогненебезпечними речовинами (ацетон, бензин) необхідно працювати з відключеними електронагрівальними приладами і мати при собі листи азбесту.

При розливі вогненебезпечної речовини на лабораторний стіл, слід засипати рідину піском, а потім цей пісок згребти на лопату і винести з приміщення.

Займання вогненебезпечних речовин від іскри чи відкритого полум'я, короткого замикання електропроводів – при всіх причинах необхідно виключити струм в лабораторії.

Якщо в лабораторії загорілась нерозчинна у воді речовина (бензин), то не можна застосовувати для гасіння воду так, як утвориться гаряча плівка.

Ефективне гасіння пожежі піском але він повинен бути сухим і сипким.

Особливості правил роботи в лабораторії:

1. Не зберігати в лабораторії велику кількість вогненебезпечних рідин.

2. Електропроводка завжди повинна бути справна. Всі електронагрівальні прилади повинні теж бути справні.
3. Всі засоби гасіння пожежі повинні бути в лабораторії.

4. Медична допомога

При проведенні практичних занять в лабораторії виникають ситуації, що потребують медичної допомоги. Для цього в аптечці повинні бути: вага, клей БФ -6, розчин йоду 3 % , борна кислота 2% , NaCl, CaCl₂, CuSO₄.

Порізи – рану очистити від сторонніх предметів, замазати йодом та перемотати .

Термічні опіки - обпалене місце посипають двовуглекислим Na, або використовують примочки свіжого розчину.

Хімічні опіки - уражену ділянку швидко промивають великою кількістю води , потім кладуть примочки на цю ділянку.

Чадний газ - цей продукт негайного окислення вуглецю – окис вуглецю.

Окис вуглецю - сильна отрута яка впливає на гемоглобін крові.

Симптоми отруєння – яскраво – рожеве забарвлення шкіри обличчя, запаморочення голови, слабкість втрата, свідомості судоми, зникнення дихання.

5. Засоби індивідуального захисту

Всі працівники лабораторії повинні бути забезпечені засобами індивідуального захисту постійного користування.

До них відносять:

- окуляри або маска;
- гумові рукавиці;
- косинки;
- нарукавники;
- халати з бавовняної тканини.

Для захисту очей від потрапляння механічних частинок служать окуляри з прозорим екраном. Від потрапляння ультрафіолетових променів використовують окуляри марки С-14.

Для захисту рук від агресивних речовин застосовують гумові рукавиці.

Для захисту органів дихання при аварійній ситуації повинен бути протигаз .

Заняття для самоперевірки.

1. Які загальні правила роботи в хімічній лабораторії?
2. Які правила роботи зі шкідливими отруйними та вогнебезпечними речовинами?
3. Які правила пожежної безпеки в лабораторії ви знаєте?
4. Розкажіть про надання першої медичної допомоги в лабораторії?
5. Якими засобами індивідуального захисту в лабораторії потрібно користуватися?

Тема 3.

ВИКОНАННЯ РОБІТ У

ХІМІКО-

БАКТЕРІОЛОГІЧНІЙ

ЛААБОРАТОРІЇ

Урок 3. Обладнання та посуд для хіміко-бактеріологічних досліджень

- 1. Посуд для хіміко-бактеріологічних досліджень**
- 2. Обладнання для хіміко-бактеріологічних досліджень**
- 3. Підготовка посуду для хіміко-бактеріологічних дослідження та його зберігання**

1. Посуд для хіміко-бактеріологічних досліджень

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає, щоб приміщення лабораторії було ізольованим від інших кімнат.

До мікробіологічної лабораторії належать: приміщення для бактеріологічних досліджень; стерильний бокс для виконання робіт в стерильних умовах; передбоксник, де знаходиться стерильний матеріал; автоклавна для стерилізації посуду, живильних середовищ та знешкодження відпрацьованого матеріалу; приміщення для миття посуду та приготування середовищ.

Бокс повинен бути обладнаним бактерицидною лампою, стіни і підлога вистелені плиткою або лінолеумом, що забезпечує можливість використання дезінфікуючих розчинів при прибиранні кімнати.

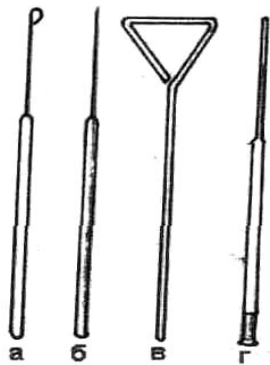
До посуду, що використовують в мікробіологічній лабораторії, відносяться пробірки, мірні циліндри, колби, чашки Петрі та ін.



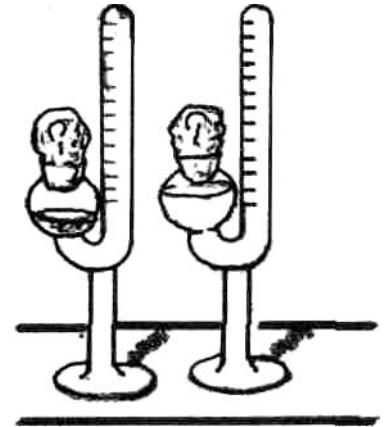
Чашки Петрі застосовують для вирощування культури мікроорганізмів на щільних поживних середовищах.

За допомогою *піпеток* проводять пересівання рідких культур мікроорганізмів.

Пробірки і колби використовують для зберігання поживних середовищ і вирощування культур мікроорганізмів.



Бродильні трубки використовують для визначення активності бродіння по газоутворенню.



Бактеріологічні голки і петлі використовують для проведення посівів мікроорганізмів, *шпателі* - для розмазання рідких культур на поверхні щільного поживного середовища.

2. Обладнання для хіміко-бактеріологічних досліджень

До необхідних інструментів та обладнання мікробіологічної лабораторії відносять: термостати, центрифуги, мікроскопи з освітлювачами, шафи сушильні, спиртівки або газові пальники, піпетки пастерівські, шпателі скляні та металеві, пінцети, ножиці, предметні та покривні скельця, петлі бактеріологічні тощо.

Основним устаткуванням мікробіологічної лабораторії є:

- ◆ термостат
- ◆ сушильна шафа
- ◆ апарат Коха
- ◆ автоклав
- ◆ мікроскоп
- ◆ ваги.

Термостат - прилад для підтримки постійності температури - застосовують для вирощування культур мікроорганізмів. Він є шафою, в якій підтримується впродовж тривалого часу певна температура.

Сушильну шафу використовують для стерилізації сухим жаром посуду, інвентаря і т. д. Матеріал, що стерилізується, заздалегідь завертають в папір і поміщають в шафу так, щоб він не торкався стінок. Стерилізацію проводять при температурі 160 °З впродовж 2 ч. Простерилізований матеріал виймають після відключення і охолодження шафи.

Апарат Коха застосовують для стерилізації поживних середовищ. Він є металевим циліндром з плоским дном і конусоподібною кришкою, яка має отвір для виходу пари. Апарат покритий теплоізолюючим матеріалом. Посудини з поживними середовищами ставлять на підставку, що знаходиться усередині апарату.

Автоклав використовують для стерилізації посуду і поживних середовищ парою під тиском. Це герметичний котел з подвійними металевими стінками і кришкою. Він забезпечений манометром, запобіжними клапанами і краном для спуску води і пари. Застосовують для стерилізації поживних середовищ під тиском 0,5-1,0 МПа впродовж 20-30 хв.

Мікроскоп використовують для встановлення форм, розмірів, будови мікроорганізмів

Ваги в лабораторії необхідно мати технічні і аналітичні. Технічні мають точність до 0,01 г; аналітичні - до 0,001 р.

Крім того використовують центрифуги і мішалки, рН-метри для визначення кислотності напівфабрикатів та ін.

3. Підготовка посуду для хіміко-бактеріологічних дослідження та його зберігання

Обов'язковою умовою успішного культивування мікроорганізмів є чисто вимитий та стерильний посуд

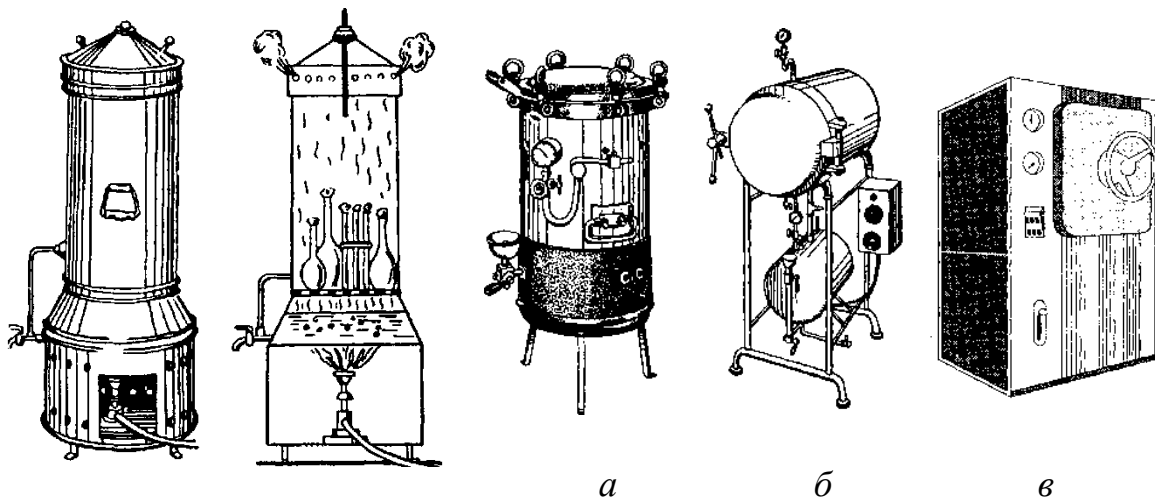
Спочатку посуд ретельно миють з використанням детергентів, а також розчину дворовоокислого калію в сірчаній кислоті (хромпик). Вимитий посуд обполіскують водопровідною, потім дистильованою водою і висушують в сушарній шафі. Щоб уникнути зараження стерильних предметів з повітря, перед стерилізацією їх закривають ватними пробками, завертають в

обгортковий папір або закривають фольгою (у склянок, колб досить загорнути тільки шийку). Потім посуд підлягає стерилізації.

Стерилізацією називається повне знищення мікробів та їхніх спор у поживних середовищах, посуді, на інструментах тощо.

Серед методів стерилізації розрізняють фізичні, хімічні, механічні. Фізичні ґрунтуються на дії високої температури і ультрафіолетового опромінювання, хімічні — на використанні хімічних антисептичних речовин. Фільтрування рідин через бактеріальні фільтри належить до механічних методів стерилізації. У мікробіологічній практиці найчастіше застосовують стерилізацію за допомогою високої температури (так звана термічна стерилізація).

Прожарювання на полум'ї. Цей метод дає добрі результати при стерилізації невеличких за розмірами лабораторних інструментів. Обпалюванням або прожарюванням на полум'ї спиртівки стерилізують бактеріологічні петлі, препарувальні голки, ланцети, пінцети, предметні та накривні скельця, скляні палички, ножиці, шпателі тощо.



Апарат Коха

Автоклави: а — вертикальний АВ-1; б — горизонтальний АГ-1; в — автоматичний АШ-250

Стерилізація сухим жаром. Чисті колби, чашки Петрі, пробірки, піпетки, різний скляний посуд, загорнутий в папір, стерилізують у спеціальній сушильній шафі при температурі 160—170 °С протягом 2 год. Стерильні предмети виймають з сушильної шафи, коли температура знизиться до кімнатної.

Стерилізація кип'ятінням. Шприци, голки, гумові предмети, хірургічні інструменти стерилізують кип'ятінням у спеціальних

стерилізаторах протягом 30 хв. Для зменшення жорсткості води та підвищення температури кипіння у стерилізатори додають 1—2 %-й розчин NaHCO_3 .

Стерилізація парою, або тиндалізація. Цей метод застосовується для стерилізації речовин, що руйнуються або змінюють властивості при нагріванні (деякі поживні середовища, сироватки, вітаміни тощо). Стерилізацію текучою парою проводять в автоклаві з відкритим паровідвідним краном або використовують апарат Коха (див. рисунок). Вона проводиться при температурі 56—58 °C по 30 хв протягом 5—6 днів поспіль.

Стерилізація парою під тиском. Найбільш надійним способом стерилізації поживних середовищ, посуду і матеріалів є стерилізація парою під тиском в автоклавах (див. рисунок). При звичайному атмосферному тиску температура водяної пари дорівнює 100 °C. При підвищенні тиску пари температура її значно підвищується. Спільна дія високої температури і тиску пари спричиняють швидку загибель не тільки вегетативних клітин мікробів, а й їхніх спор.

Пастеризація. Метод, запропонований Л. Пастером, застосовується для знезараження харчових продуктів: молока, соків, пива, вина тощо. При цьому матеріал нагрівається при температурі 50—65 °C протягом 15—30 хв або при 70—80 °C — 5—10 хв. Цей метод використовують для знищення неспороносних мікробів. Він може проводитися в термостаті або на водяній бані.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. З цією метою використовують бактерицидні лампи. Метод застосовується для стерилізації повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах, операційних, а також деяких предметів і матеріалів. Час опромінення — 20 хв.

Під **хімічною стерилізацією**, або **дезінфекцією** розуміють знезаражування матеріалів, предметів тощо за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують розчин карболової кислоти (3—5 %), лізолу (1—3 %), формаліну (4 %), хлораміну (1—5 %), хлорного вапна (10—20 %) та інші. Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як консерванти при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин тощо.

До **механічної стерилізації** належить фільтрування. Найчастіше стерилізацію фільтруванням застосовують для рідин, що змінюють свої властивості при нагріванні (сироватки, деякі поживні середовища, що містять

білки тощо). Фільтрування рідин проводять через спеціальні дрібнопористі фільтри (свічки Шамберлана що їх виготовляють із каоліну, піску і кварцу, фільтри Бергфельда - з інфузорної землі, фільтри Зейтца - із азбесту, а також мембранні фільтри, виготовлені з нітроклітковини). Пори таких фільтрів пропускають рідину, а бактерії затримують.

Завдання для самоперевірки

1. Назвіть основну вимогу до мікробіологічної лабораторії
2. Які приміщення входять до складу мікробіологічної лабораторії?
3. Який посуд використовують в мікробіологічній лабораторії?
4. Яке призначення мають чашки Петрі?
5. За допомогою якого посуду проводять пересівання рідких культур мікроорганізмів?
6. З якою метою використовують пробірки і колби?
7. Для чого служать бродильні трубки?
8. Як використовують бактеріологічні голки і петлі?
9. Перелічіть інструменти та обладнання мікробіологічної лабораторії?
10. Назвіть основне устаткування мікробіологічної лабораторії?
11. Охарактеризуйте термостат
12. Охарактеризуйте сушильну шафу
13. Охарактеризуйте апарат Коха
14. Охарактеризуйте автоклав
15. З якою метою використовують мікроскоп?
16. Яка умова успішного культивування мікроорганізмів?
17. Як готують посуд до мікробіологічних досліджень?
18. Що називається стерилізацією?
19. Які є методи стерилізації?
20. В яких випадках використовують прожарювання на полум'ї?
21. В яких випадках використовують стерилізацію сухим жаром.
22. В яких випадках використовують стерилізацію кип'ятінням.
23. В яких випадках використовують стерилізацію парою? В якому приладі вона проводиться?
24. Що собою представляє пастеризація?
25. З якою метою проводять стерилізацію ультрафіолетовими променями?
26. Що розуміють під хімічною стерилізацією, або дезінфекцією?
27. Що собою представляє механічна стерилізація? Коли її використовують?

Урок 4.

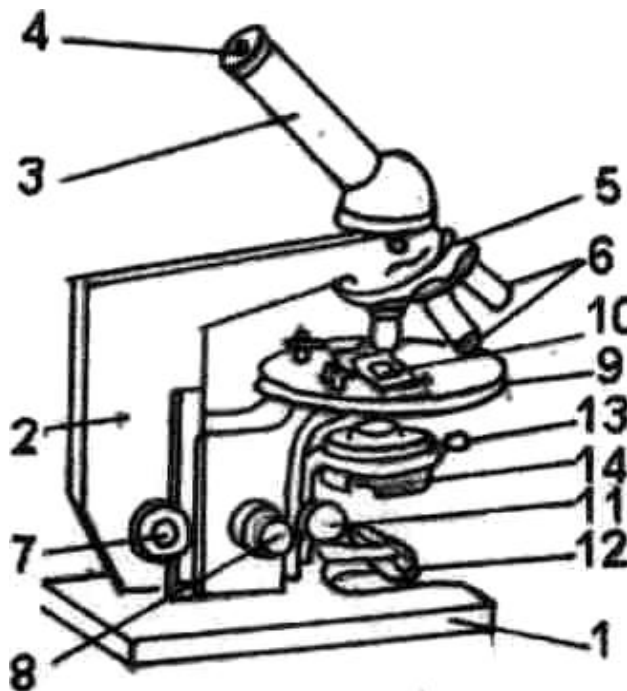
Вивчення прийомів роботи з оптичними мікроскопами.

1. Будова біологічного мікроскопа.
2. Правила роботи з біологічним мікроскопом
3. Мікроскопія в темному полі
4. Фазово-контрастна мікроскопія
5. Люмінісцентна мікроскопія

1. Будова біологічного мікроскопа.

Можливості людського ока обмежені природою. Для того, щоб збільшити можливості людського ока, люди здавна почали використовувати збільшувальне скло (лінзи). Фактично, це були перші найпростіші мікроскопи. Вони надавали можливість розгледіти нові деталі, які не було видно неозброєним оком. Лупи використовуються і зараз (наприклад, зоологами, щоб розгледіти будову комахи, ботаніками та в інших подібних випадках, коли необхідно розгледіти більш крупні, ніж мікроорганізми,

об'єкти). Щоб дістати велике збільшення, застосовують мікроскоп.



Мікроскоп (від грецького слова мікрос - малий, скопію - дивлюся) - це оптичний прилад, що складається з трьох основних частин: механічної, освітлювальної та оптичної.

Механічна частина, або штатив, складається з наступних деталей: ніжки (І) - металевої плити, що служить опорою мікроскопа, тубусотримача (2) у формі ручки, за яку тримають мікроскоп при перенесенні, тубуса (3) - зорової трубки мікроскопа. У верхній отвір тубуса вільно вставимо окуляр (4), на нижньому кінці тубуса знаходиться револьвер

(5), що обертається навколо своєї осі, в який угвинчені об'єктиви (6). Обертаючи "револьвер", можна змінити об'єктиви під час роботи з мікроскопом, підводячи будь-який об'єктив під тубус: маленька пружинка, захиплюючись у свій паз, утримує об'єктив в цьому положенні. При встановленні об'єктиву відчувається клацання. тубус переміщається уздовж оптичної осі мікроскопа за допомогою двох гвинтів – мікрометричного (7) і мікрометричного (8).

Макрометричний гвинт служить для грубої установки фокусу, тобто на ту відстань препарату, при якому він робиться видимим. Для точної установки об'єктиву служить мікрометричний гвинт. Повний оберт його переміщає тубус на 0,1 мм, поворот на одно ділення переміщає тубус на 0,002 мм дай 2 мкм

Мікрометричний гвинт є однією з найбільш чутливих частин мікроскопа і поводитися з ним слід особливо обережно. Препарат, що вивчається, поміщають на предметний столик (9) і закріплюють наявними на ній затискачами (клемами) (10). У центрі столика є отвір для проходження світла, освітлюючого препарат.

Поряд з мікрометричним гвинтом знаходиться гвинт для регулювання конденсора (II).

Освітлювальна частина мікроскопа знаходиться під предметним столиком і складається з дзеркала (12) і конденсора з діафрагмою (13) і світлофільтром (14) Конденсор є двоопуклою лінзою, яка збирає відбиті від дзеркала промені світла в пучок і направляє його в площину препарату, що забезпечує найкраще освітлення об'єкту. Піднімаючи і опускаючи конденсор, можна регулювати міру освітленості препарату, в нижній частині конденсора розташована ірисова діафрагма, за допомогою якої також можна міняти яскравість освітлення, звужуючи або повністю розкриваючи її.

Дзеркало зазвичай рухливе і двостороннє: з одного боку плоске, а з іншої - увігнуте. Увігнутим дзеркалом користуються при штучному освітленні

Оптична частина мікроскопа складається з об'єтивів (6) і окуляра (4).

Об'єктив складається з системи лінз, поміщених в металеву оправу. Він має збільшувальну здатність і певну глибину фокусу. Чим більше кривизни лінз, тим коротше фокусна відстань і більше збільшення об'єктиву. Об'єктив дає дійсне збільшене зворотне зображення предмета. Об'єктиви підрозділяються

на сухі і імерсійні. При розгляді препарату сухим об'єктивом між його фронтальною (зверненою до предмета) лінзою і препаратом знаходиться повітря. Промені світла проходять через покривне скло, повітря, скло об'єктиву. Усі ці середовища мають різний показник заломлення, тому частина променів світла відхиляється і не потрапляє в об'єктив.

Окуляр складається з двох лінз, поміщених в загальну металеву оправу. Окуляр збільшує зображення, дане об'єктивом. Збільшення, яке дає окуляр, вказується на самому окулярі (7х, 10х, 15х та ін.).

Для визначення загального збільшення предмета мікроскопом потрібне збільшення об'єктиву помножити на збільшення окуляра.

2. Правила роботи з біологічним мікроскопом

Мікроскоп виймають з футляра і переносять до робочого місця, тримаючи його однією рукою за тубусотримач, а іншою рукою підтримуючи за основу штатива. Нахилити мікроскоп убік не можна, оскільки при цьому окуляр може випасти з тубуса.

Мікроскоп поміщають на робочому столі тубусотримачем до себе на відстані 3-5 см від краю столу. Встановлюють правильне освітлення поля зору мікроскопа. Для цієї мети, дивлячись в окуляр мікроскопа, дзеркалом направляють промінь світла від джерела світла в об'єктив. Налаштування освітлення здійснюється з об'єктивом 8х(10х). При правильній установці поле зору мікроскопа виглядатиме у виді добре і рівномірно освітленого круга.

На предметний столик поміщають досліджуваний препарат та закріплюють його клемами. Спочатку препарат розглядають з об'єктивом 8х, в потім переходять до великих збільшень.

Закінчивши перегляд препарату, спочатку піднімають тубус, а потім препарат знімають із столика.

Для захисту об'єктиву від пилу окуляр мікроскопа слід залишати в тубусі. При зміні окулярів потрібно стежити за тим, щоб в тубус не потрапив пил.

3. Мікроскопія в темному полі

В основі методу лежить явище Тиндалля – освітлення об'єкта косими променями світла. Метод використовується при дослідженні живих клітин

мікроорганізмів. Особливо він корисний для функціонально-морфологічного вивчення великих об'єктів, таких як дріжджі.

4. Фазово-контрастна мікроскопія

Людське око розрізняє тільки довжину (колір) і амплітуду (інтенсивність, контрастність) світлової хвилі, але не вловлює фазових відмінностей.

Метод фазово-контрастної мікроскопії розроблено для спостереження за прозорими об'єктами. Він ґрунтується на перетворенні невидимих для людського ока фазових змін світлової хвилі

Метод застосовують для дослідження живих клітин мікроорганізмів

5. Люмінісцентна мікроскопія

Деякі біологічні об'єкти здатні поглинати світло і потім випромінювати промені з іншою довжиною хвилі. При цьому клітини немов би світяться жовто-зеленим або оранжевим світлом. Це так звана власна, або первинна, люмінесценція.

Люмінесцентна мікроскопія у порівнянні зі звичайною дозволяє: поєднувати кольорове зображення і контрастність об'єктів; вивчати морфологію живих і мертвих клітин мікроорганізмів у живильних середовищах і тканинах тварин та рослин; досліджувати клітинні мікроструктури, які вибірково поглинають різні флуорохроми; визначати функціонально-морфологічні зміни клітин; використовувати флуорохроми при імунологічних реакціях і підрахунку бактерій в зразках з невисоким їх вмістом.

Завдання для самоперевірки

1. Що таке мікроскоп?
2. Опишіть будову біологічного мікроскопа
3. Які правила роботи з біологічним мікроскопом?
4. Які сучасні мікроскопи ви знаєте?
5. Що вони собою представляють?

Урок 5.

Освоєння техніки приготування поживних середовищ

1. Методи культивування мікроорганізмів
2. Приготування живильних середовищ для мікроорганізмів
3. Правила приготування бактеріологічних препаратів

1. Методи культивування мікроорганізмів

Вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах називається **культивуванням** (lat. *cultus* – вирощування), а вирощені мікроорганізми – **культурою**.

При вирощуванні мікроорганізмів у рідкому середовищі культури утворюють суспензії, осад або плівку, при вирощуванні на твердому середовищі – колонії.

Внесення клітин мікроорганізмів чи іншого дослідного матеріалу (зразки ґрунту, проби води) в стерильне поживне середовище для отримання накопичувальної культури називається **посівом**.

Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища до іншого (стерильного) називається **пересівом**. Культивування мікроорганізмів за певної температури називають **інкубуванням** (лат. *incubatio* – вирощування за штучно створеної температури).

Вирощують мікроорганізми у скляному посуді: пробірках, колбах, чашках Петрі.

В пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на твердих середовищах.

Мікроорганізми в колбах культивують переважно в рідких живильних середовищах.

В чашках Петрі мікроорганізми вирощують тільки на твердих середовищах.

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі, шпателі, які виготовляють з платинового дроту або ніхром.

При тривалому зберіганні мікроорганізмів у лабораторних умовах може відбутися зміна певних фізіологобіохімічних чи морфологічних характеристик. Тому необхідно здійснювати пересів культур на свіжі середовища з певною частотою залежно від виду, середовища, умов культивування. При такому зберіганні не можна допускати пересихання середовища.

2. Приготування живильних середовищ для мікроорганізмів

У лабораторних умовах мікроорганізми культивують на живильних середовищах, які повинні мати всі речовини, необхідні для їх росту. Конструктивні і енергетичні процеси у мікроорганізмів дуже відрізняються. Тому так само відрізняються їх потреби у живильних речовинах. Універсальних середовищ, однаково придатних для росту всіх без винятку мікроорганізмів, не існує. Відомо дуже багато живильних середовищ (ще в 1930 р. було класифіковано більше 2000 середовищ). В той же час число інгредієнтів, які становлять основу живильних середовищ, невелике.

За складом прийнято розрізняти натуральні (природні) і синтетичні середовища.

Натуральними зазвичай називають середовища, які складаються з продуктів тваринного або рослинного походження, і мають складний невизначений хімічний склад.

До них належать овочеві чи фруктові соки, м'ясо, кров, молоко, відвари або екстракти, отримані з м'яса, риби, ґрунту, гною чи овочів. До числа натуральних середовищ, які часто використовують у лабораторній практиці, відносять м'ясопептонний бульйон і неохмелене пивне сусло.

М'ясопептонний бульйон (МПБ). Основою для його виготовлення служить м'ясна вода, яку готують таким чином: пропущене через м'ясорубку волове м'ясо, попередньо звільнене від жиру, кісток і сухожил'я заливають подвійним об'ємом водопровідної води та витримують 24 год при температурі, близькій до кипіння. Настій кип'ятять 1 год з м'ясом або без нього, і фільтрують через кілька шарів марлі. До 1 л отриманої м'ясної води

додають 10 г пептону і 15 г хлориду натрію, доводять рН до значення 7,0. Для отримання м'ясопептонного агару (МПА) до МПБ додають 1,52,0 % агару. МПБ і МПА стерилізують при 1 атм. протягом 20 хв.

Дріжджовий екстракт . 1 кг пресованих дріжджів розводять в 1л води, кип'ятять протягом 1 год, кілька разів фільтрують і стерилізують при 0,5 атм протягом 30 хв.

Синтетичні середовища – це середовища, до складу яких входять певні хімічні сполуки, взяті у точно вказаній кількості. Синтетичні середовища широко використовують при дослідженні метаболізму мікроорганізмів. Існує багато прописів синтетичних середовищ, які забезпечують ріст різних мікроорганізмів.

Поряд з натуральними і синтетичними виділяють так звані *напівсинтетичні середовища*. Основним їх компонентом є синтетичні середовища, до яких додають у невеликій кількості речовини невизначеного складу: пептон (джерело азотного живлення), дріжджовий автолізат (джерело вітамінів групи В, піримідинових і пуринових основ), гідролізат казеїну (джерело амінокислот). Напівсинтетичні середовища широко застосовуються в мікробіологічній промисловості для отримання вітамінів, антибіотиків, амінокислот тощо.

За консистенцією розрізняють рідкі, сипкі і тверді середовища.

Рідкі середовища широко застосовують для накопичення біомаси чи продуктів обміну мікроорганізмів, для підтримки і збереження колекції культур мікроорганізмів, які погано розвиваються на твердих середовищах.

Сипкі середовища застосовують у мікробіологічній промисловості для нарощування міцелію грибів. До таких середовищ відносять розварене пшоно, висівки, ячмінь, пшеницю, жито тощо.

Тверді середовища використовують для виділення чистих культур, для визначення кількості мікроорганізмів, їх біологічної активності, для збереження культур у колекціях тощо. Для ущільнення середовищ використовують агар або желатин.

Агар – складний полісахарид, якій отримують з морських водоростей. Він здатний утворювати гелі, які плавляться при температурі приблизно 100°C і стають твердими при 45°C.

Желатин – білок, який отримують виварюванням кісток, хрящів, сухожиль, луски. Желатин плавиться при температурі 25°C, яка нижча за

звичайну температуру інкубації багатьох мікроорганізмів (30 – 37 °C). Ця властивість желатину обмежує його застосування для ущільнення середовища.

Заняття для самоперевірки

1. Що називається культивуванням?
2. Які мікроорганізми називають культурою.
3. Дайте поняття посіву та пересіву
4. Що таке інкубування
5. Який посуд використовують для вирощування мікроорганізмів?
6. Що таке живильне середовище?
7. Як класифікують живильні середовища?

Урок 6

Освоєння техніки посіву культур мікроорганізмів на різні поживні середовища.

1. Правила приготування бактеріологічних препаратів
2. Техніка посіву бактеріологічних препаратів в пробірки

1. Правила приготування бактеріологічних препаратів

Бактеріологічне дослідження - дослідження, призначене для виділення бактерій і вивчення їх властивостей з метою постановки мікробіологічного діагнозу.

Досліджуваний матеріал варто брати в асептичних умовах у стерильний посуд і доставляти в лабораторію як можна швидше. У разі необхідності проби слід зберігати на холоді. Методика взяття проб залежить від об'єкту, характеру захворювання і властивостей мікроорганізму. Одним з поширених прийомів бактеріологічного дослідження є бактеріоскопія.

Важливою умовою при бактеріоскопічних дослідженнях є дотримання заходів асептики – а саме, використання стерильного обладнання та розчинів і запобігання їх забруднення в процесі роботи. Бактерії і спори грибів широко поширені в навколишньому середовищі, в тому числі і в лабораторіях. Мікробіологи повинні постійно дбати про стерильності живильного середовища і устаткування. Ці «незручності» - невід'ємна частина роботи будь-якого мікробіолога. У лабораторіях шкіл і коледжів вчать тільки основним заходам обережності. Для рутинної мікробіологічної роботи необхідні особливим чином обладнані лабораторії. Вони повинні мати поверхні, які легко очищати, і спеціально відгороджені місця для роботи (бокси), де забезпечується подача фільтрованого стерильного повітря.

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися певних правил з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів, а саме:

Техніка безпеки з живими культурами

- відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
- під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними;
- відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати за полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором униз;
- під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
- скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника;
- залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка зпалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
- не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
- після закінчення роботи ватю, змоченою 70 % етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

2. Техніка посівів мікроорганізмів в пробірки.

Посіви проводять як з метою виділення збудників із досліджуваного матеріалу від хворих, так і для нагромадження чистих культур з метою подальшого їх вивчення та ідентифікації. Техніка посівів у рідкі та на щільні живильні середовища має свої особливості.

У ліву руку беруть дві пробірки. В одній знаходиться живильне середовище (щільне або рідке), в іншій – досліджуваний матеріал. Пробірки затискають великим та вказівним пальцями. Для того, щоб можна було спостерігати за вмістом пробірок, їх тримають зверху кисті руки. Пробірки повинні бути дещо нахиленими, і потрібно стежити, щоб при відкриванні їх матеріал або сторонні мікроби зповітря та навколишніх предметів з однієї не потрапили в іншу. Корки з пробірок виймають, тримаючи їх 4 і 5 пальцями правої руки. Трьома іншими пальцями правої руки, як олівець, тримають бактеріологічну петлю або піпетку, якими розподіляють досліджуваний матеріал.

Спочатку стерилізують петлю у верхній частині полум'я газового пальника. Пробірки відкривають і край їх проносять через полум'я пальника.

Петлю опускають у пробірку, де є досліджуваний матеріал, і, обережно торкаючись стінки, охолоджують. У подальшому петлю опускають у пробірку і набирають матеріал. Якщо він знаходиться у рідкому стані, для посіву достатньо краплі рідини, яка затримується в кільці бактеріологічної петлі. Коли використовують мікроби, що вирости на поверхні середовища, обережно плавним рухом набирають невелику кількість їх, стежачи, щоб не ушкодити живильне середовище. Петлю повільно виймають з пробірки, не торкаючись її стінок, і переносять в іншу пробірку з середовищем. Штриховими рухами від однієї стінки пробірки до іншої, починаючи з нижньої частини середовища, проводять посів матеріалу по скошеній поверхні агару знизу догори.

Петлю виймають з пробірки, корки і краї пробірок проносять через полум'я і закривають. Петлю прожарюють у полум'ї, щоб знищити мікроорганізми.

При посіві матеріалу на рідке живильне середовище петлю з матеріалом занурюють у рідину. Якщо він не знімається з петлі, його обережно розтирають на стінці пробірки й омивають середовищем.

Матеріал, який набирали пастерівською або градуйованою піпеткою, виливають у живильне середовище, а для рівномірного розповсюдження його пробірку обережно, щоб не замочити корок, струшують або обертають, затиснувши в долонях.

Завдання для самоперевірки

1. Що таке живильне середовище?
2. Як класифікують живильні середовища?
3. Що таке бактеріологічні дослідження?
4. Які правила приготування бактеріологічних препаратів?
5. Охарактеризуйте техніку посіву бактеріологічного матеріалу в пробірки?

Урок 7

Техніка посівів бактеріологічних препаратів в чашки Петрі

1. Посів штрихом
2. Посів заливкою
3. Посів уколом

1. Посів штрихом

Посів в чашки Петрі здійснюють на тверді середовища. Чашкою називають чашку Петрі, яка містить живильний агар. Чашки Петрі - спеціально виготовлені неглибокі круглі контейнери, які можуть бути скляними або пластиковими. Вони використовуються для росту бактерій, грибів або культури тканин на твердому живильному середовищі.

Метод представлений на малюнку. Він застосовується для виділення чистих колоній бактерій з суміші бактерій. Для посіву використовують дротяну петлю, яку спочатку потрібно прожарити, як показано на рис. , щоб протерилізувати. Потім за допомогою петлі беруть тонку плівку рідкої суспензії або невелику кількість твердого матеріалу, що містить досліджувані мікроорганізми, з попередньо вирощеної культури чи іншого джерела мікроорганізмів. Петлею м'яко проводять по поверхні середовища, роблячи серії штрихів (див. рисунок)

Після кожної серії штрихів чашку трохи повертають, так щоб в кожній новій серії розподілялися бактерії з попередньої серії штрихів, виснажуючи таким чином штрихи до окремих бактерій. Коли метод відпрацьований, штрихи можна робити дуже швидко.



2. Посів заливкою

Певний обсяг (до $0,5 \text{ см}^3$) клітинної суспензії вносять у відповідний обсяг (близько $15\text{-}20 \text{ см}^3$) простерилізованого розплавленого в невеликому флаконі поживного агару, який попередньо був охолоджений до $45\text{-}50^\circ\text{C}$ у водяній бані. Знімають кришку і перед додаванням клітинної суспензії пропалюють шийку флакона.

Суспензію клітин ретельно перемішують з поживним агаром, повертаючи (не струшуючи) назад і вперед затиснутий в долонях флакон.

Потім виливають суміш в стерильну чашку Петрі, як показано на малюнку. Підписують денце чашки і інкубують її.

3. Посів уколом

Метод використовують для культивування анаеробних організмів або організмів, що ростуть при низькій концентрації кисню (мікроаерофілов). Зазвичай використовують пробірку з живильним твердим середовищем.

Завдяки невеликій поверхні і досить великій глибині агару в пробірці в порівнянні з чашкою доступ кисню всередину агару обмежується. Посів роблять прямим дротиком (без петлі), або бактеріологічної голкою. Невелику кількість культури (твердої або рідкої) беруть кінчиком голки і потім вертикально проколюють нею агар. Культура росте в агарі в усі боки від лінії проколу.

Завдання для самоперевірки

1. Які правила заливки чашок Петрі?
2. Які методи посіву ви знаєте?
3. Охарактеризуйте метод посіву на поверхню агару
4. Що собою представляє метод посіву заливкою
5. Охарактеризуйте метод посіву уколом

Урок 8

Методи ідентифікації мікроорганізмів.

1. Бактеріоскопія

2. Метод фіксованих забарвлених препаратів

1. Бактеріоскопія

Бактеріоскопія - найбільш доступний прийом, заснований на мікроскопічному вивченні матеріалу.

Більш чітко бактерії можна виявити в забарвленому препараті. Досліджуваний матеріал наносять на предметне скло тонким і по можливості рівним шаром. Дають препарату висохнути на повітрі і фіксують одним із загальноприйнятих методів, але найчастіше фламбирования, тобто двох-, триразовим швидким проведенням препарату над полум'ям пальника так, щоб скло було тепле, але не гаряче. Препарат, остуджений після фіксації, забарвлюють

Методом бактеріоскопії широко користуються для бактеріологічної діагностики деяких інфекційних захворювань

2. Метод фіксованих забарвлених препаратів

Для вивчення форми прокаріотної клітини найчастіше використовують метод фіксованих забарвлених препаратів.

Виготовлення мікробіологічного препарату даним методом включає ряд послідовних операцій:

1. Виготовлення мазка.

На чисте знежирене предметне скло нанести невелику краплю дистильованої води, в неї за допомогою стерильної бактеріальної петлі внести невелику кількість маси мікроорганізмів і розподілити по поверхні скла. Мазок повинен бути тонким, діаметром близько 1 см. Якщо культура мікроорганізмів вирощувалася на рідкому живильному середовищі, за допомогою стерильної піпетки на чисте знежирене предметне скло наносять невелику краплю культуральної рідини, яка містить мікроорганізми. Краплю,

яка містить мікроорганізми можна розподілити по склу за допомогою стерильної бактеріальної петлі, або розподілити за допомогою грані іншого предметного (покривного) скла.

2. Висушування мазка.

Проводять без нагрівання, при кімнатній температурі до повного випаровування води з поверхні предметного скла.

3. Фіксація мазка.

Проводиться з метою:

- ❖ вбити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними;
- ❖ прикріпити мазок до поверхні скла, щоб він не змився при подальших маніпуляціях;
- ❖ зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин.

Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3-4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутріклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96%), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном, тощо.

4. Забарвлення мазка.

Може бути простим (використовується один барвник) і диференціальним (використовується кілька барвників у певній послідовності). На охолоджений після фіксування мазок піпеткою наносять кілька крапель барвника (мазок повинен бути повністю вкритий шаром барвника), при цьому піпетка не повинна торкатися поверхні скла. Для кожного барвника існує свій час контакту з поверхнею зафіксованих клітин. У разі диференціального забарвлення барвники витримують на мазку вказаний у методиці час і змивають водою або певним розчином.

5. Промивання препарату.

Проводять дистильованою водою до “чистої води”, тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом і струм води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

6. Висушування препарату.

Промите скло ретельно витирають з нижнього боку клаптиками фільтрувального паперу, а з іншого боку – обережно промокають воду з залишками барвника та висушують на повітрі або над полум'ям пальника. У разі неякісного висушування скла погіршується якість зображення під мікроскопом.

Заняття для самоперевірки

1. Дайте характеристику процесу виготовлення фіксованого забарвленого препарату
2. Який принцип методу підрахунку колоній?
3. З якою метою проводять розведення бактеріальних суспензій?
4. Яким чином проводять розведення бактеріальних суспензій

Урок 9.

Кількісний облік мікроорганізмів

1. Метод підрахунку колоній

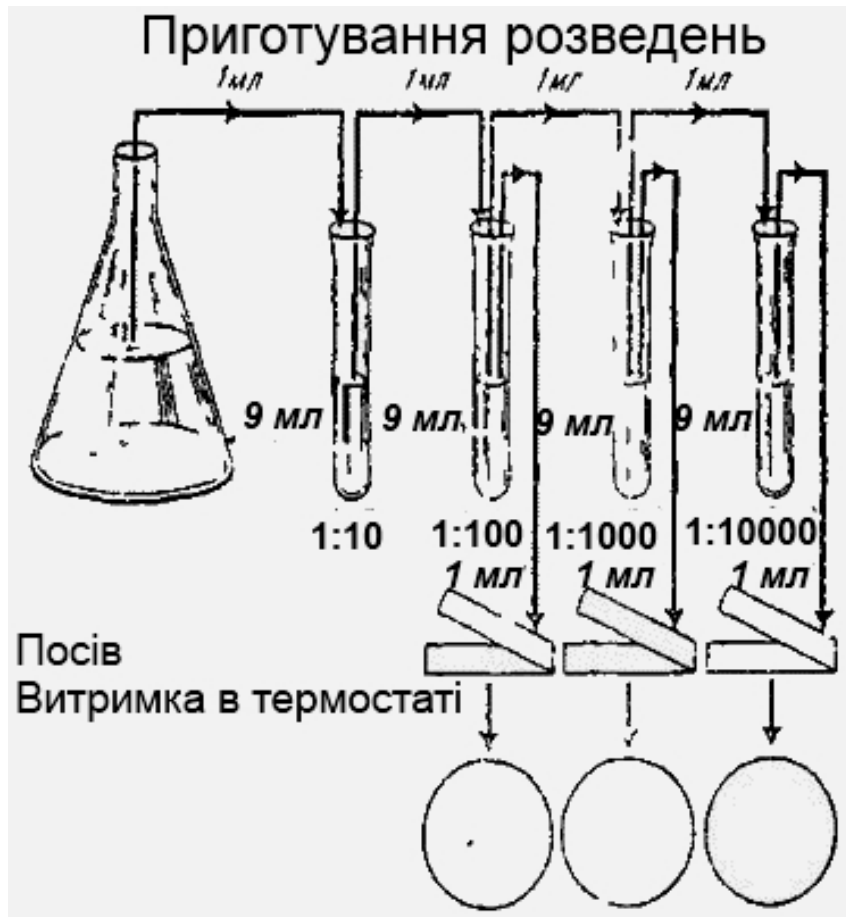
Метод підрахунку колоній

Для підрахунку кількості живих мікроорганізмів найчастіше використовують метод підрахунку колоній.

Принцип цього методу полягає в тому, що на поживний агар вносять посівний матеріал певного об'єму з таким розрахунком, щоб колонії, які утворюються кожною бактеріальною клітиною, знаходились на певній відстані одна від одної. По їхній кількості визначають кількість живих мікроорганізмів у вихідній культурі.

Різні методи підрахунку колоній відрізняються, в основному, за способом вирощування колоній. Один із способів полягає в тому, що посівний матеріал рівномірно розподіляється по поверхні добре висушеного живильного агару. При іншому посівний матеріал спочатку змішують з розплавленим агаром, температура якого не набагато перевищує температуру топлення (45-48°C), після чого відразу розливають у чашки і перед інкубацією дають застигнути при кімнатній температурі. Змішаний з культурою агар розливають або в порожні чашки, або на поверхню застиглого живильного агару (двошаровий метод).

Для того, щоб отримати окремі колонії, бактеріальні суспензії доводиться, як правило, розводити.



Знаючи кількість колоній на чашці і враховуючи здійснені розведення, можна обчислити кількість життєздатних клітин мікроорганізмів в 1 мл суспензії.

Заняття для самоперевірки

6. Що називається культивуванням?
7. Які мікроорганізми називають культурою.
8. Дайте поняття посіву та пересіву
9. Що таке інкубування
10. Який посуд використовують для вирощування мікроорганізмів?
11. Що таке живильне середовище?
12. Як класифікують живильні середовища?
13. Що таке бактеріологічні дослідження?
14. Які правила приготування бактеріологічних препаратів?
15. Які правила заливки чашок Петрі?
16. Які методи посіву ви знаєте?
17. Охарактеризуйте метод посіву на поверхню агару
18. Що собою представляє метод посіву заливкою
19. Охарактеризуйте метод посіву уколом

20. Дайте характеристику процесу виготовлення фіксованого забарвленого препарату
21. Який принцип методу підрахунку колоній?
22. З якою метою проводять розведення бактеріальних суспензій?
23. Яким чином проводять розведення бактеріальних суспензій

Список використаної літератури

1. Берлин А.Я. Техника лабораторной работы в органической химии. – М.: Химия, 1973. – 368 с.
2. Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. – М.: Химия, 1968. – 944 с.
3. Воскресенский П.И. Техника лабораторных работ. М.: Химия, 1973. – 717 с
4. Днепровский А.С., Темникова Т.М. Теоретические основы органической химии. – Л.: Химия, 1991. – 560 с
5. Довгань В. П. Хіміко-бактеріологічний аналіз: - К.: А.С.К., 2005. – 320 с
6. Захаров Л.Н. Техника безопасности в химических лабораториях. – Л.: Химия, 1991. – 336 с.
7. Ингольд К.К. Теоретические основы органической химии. – М.: Мир, 1973 – 1055 с.
8. Крищенко В.П. Техніка лабораторних робіт : Посібник. – К.: Урожай, 1990 – 228 с.
9. Руководство к практическим занятиям по методам санитарно – гигиенических исследований : Учебное пособие . Под . ред. . Л . Г . Подуновой . – М . : Медицина . 1990 . – 304 с.
10. <http://orgchemlab.com/index.php/reflux-and-heating.html>
11. http://chemistry-chemists.com/N6_2011/U7/ChemistryAndChemists_6_2011-U7-8.html