

Практична робота 1

ТЕМА: «ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ЛАБОРАТОРНИМ ОБЛАДНАННЯМ ЛАБОРАТОРІЇ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ»

Мета роботи: ознайомити здобувачів вищої освіти з основними видами лабораторного обладнання, приладів та інструментів, що використовуються для проведення мікробіологічного аналізу; сформувати практичні навички їх правильного й безпечного використання під час мікробіологічних досліджень.

Матеріали та обладнання: світлові біологічні мікроскопи; автоклав; сушильна шафа; термостат (інкубатор); центрифуга; рН-метр; лабораторні ваги; ламінарна шафа або бокс біологічної безпеки (за наявності); автоматичні дозатори; бактеріологічні петлі та голки; шпателі; пінцети; штативи; предметні та покривні скельця; пробірки; чашки Петрі; конічні колби; піпетки та наконечники; поживні середовища; демонстраційні мікробіологічні препарати; імерсійна олія; засоби для очищення оптики; дезінфекційні засоби та засоби індивідуального захисту.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

І. МІКРОБІОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ ТА ЇЇ ОСНОВНЕ ОБЛАДНАННЯ

Мікробіологічна лабораторія – це спеціально обладнане приміщення, призначене для проведення досліджень мікроорганізмів, їх виділення, культивування, ідентифікації та визначення окремих біологічних властивостей. Організація роботи лабораторії повинна забезпечувати належні умови для проведення мікробіологічного аналізу, запобігати контамінації досліджуваного матеріалу та сприяти безпечній роботі персоналу.

Приміщення лабораторії мають бути добре освітленими, вентиляльованими, з поверхнями, придатними для регулярного очищення та дезінфекції. Робочі столи виготовляють або покривають матеріалами, стійкими до дії вологи, мийних і дезінфекційних засобів.

Залежно від призначення мікробіологічна лабораторія може включати основне робоче приміщення, зону для підготовки поживних середовищ, стерилізаційну, мийну, приміщення або спеціально обладнану зону для роботи з культурами мікроорганізмів, а також місця для зберігання лабораторного посуду, реактивів і культур.

До **основного обладнання**, яке застосовують під час мікробіологічного аналізу, належать:

1. **Мікроскопи** – використовують для вивчення морфологічних особливостей мікроорганізмів, їх клітинної будови, форми, розмірів, характеру розташування клітин та інших ознак.

2. **Автоклави** – призначені для стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду, інструментів та інших матеріалів насиченою водяною парою під тиском.

3. **Сушильні шафи** – застосовують для висушування лабораторного посуду, а за відповідних режимів – для сухоповітряної стерилізації термостійких матеріалів.

4. **Термостати та інкубатори** – забезпечують підтримання заданої температури, необхідної для культивування мікроорганізмів.

5. **Ламінарні шафи та бокси біологічної безпеки** – використовують для виконання робіт, які потребують контрольованих асептичних умов. Тип обладнання обирають відповідно до характеру мікробіологічних робіт і необхідного рівня захисту.

6. **Центрифуги** – призначені для розділення компонентів суспензій і рідких середовищ під дією відцентрової сили.

7. **Водяні бані та термоблоки** – використовують для нагрівання та підтримання зразків за заданої температури.

8. **Лабораторні ваги** – застосовують для точного зважування компонентів поживних середовищ, реактивів та досліджуваних матеріалів.

9. **pH-метри** – призначені для визначення кислотності поживних середовищ, розчинів та інших досліджуваних матеріалів.

10. **Холодильне обладнання** – використовують для короточасного зберігання поживних середовищ, реактивів, зразків та інших матеріалів відповідно до встановлених умов.

Важливе значення мають також допоміжні засоби: дозатори, штативи, пінцети, бактеріологічні петлі та голки, шпателі, пробірки, колби, чашки Петрі, предметні й покривні скельця та інший лабораторний посуд.

II. ІНСТРУМЕНТИ ТА ЛАБОРАТОРНИЙ ПОСУД ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Для відбору, перенесення, посіву та пересіву культур мікроорганізмів використовують бактеріологічні петлі, голки, шпателі, пінцети та інші спеціальні інструменти.

Бактеріологічна петля призначена для перенесення невеликої кількості мікробної культури та виконання посівів на поживні середовища.

Бактеріологічну голку використовують, зокрема, для роботи зі щільними поживними середовищами та виконання посіву у товщу середовища. **Шпателі** застосовують для рівномірного розподілення мікробної суспензії поверхнею твердого поживного середовища.

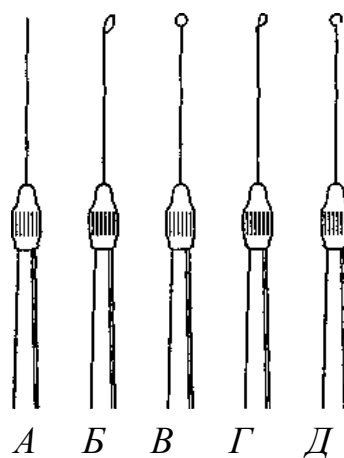


Рис. 1. Бактеріологічні голка, шпатель та петлі:

А - голка; Б - шпатель; В-Д - петлі (В – правильно зроблені; Г, Д – неправильно зроблені)

Для культивування мікроорганізмів використовують пробірки, чашки Петрі, конічні колби та інший стерильний лабораторний посуд. Для виготовлення мікроскопічних препаратів застосовують предметні та покривні скельця, а для окремих методів дослідження — предметні скельця з лунками.

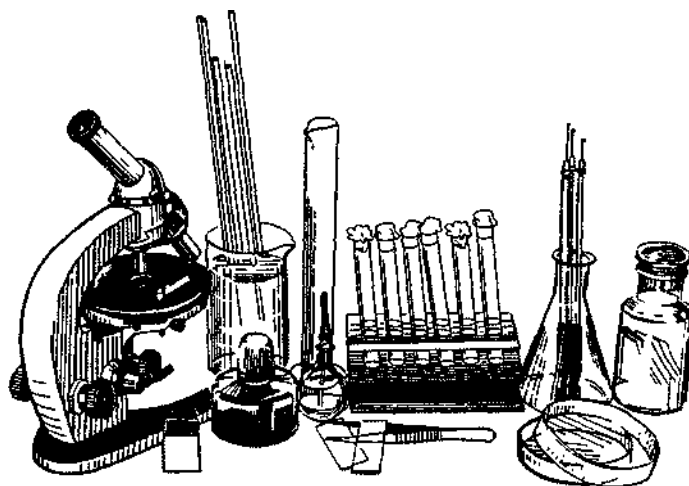


Рис. 2. Інвентар, необхідний для проведення лабораторних робіт

III. СВІТЛОВИЙ МІКРОСКОП ЯК ОСНОВНИЙ ПРИЛАД МІКРОБІОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Світловий мікроскоп є одним з основних приладів мікробіологічної лабораторії. Він призначений для отримання збільшеного зображення мікроскопічних об'єктів та дослідження їх морфологічних особливостей.

Основними складовими світлового мікроскопа є **механічна, оптична та освітлювальна системи**.

До механічної частини належать основа і штатив, предметний столик, револьверний пристрій, тубус або головка мікроскопа, механізми грубого та точного фокусування.

Оптична система представлена насамперед **об'єктивами та окулярами**. Об'єктив формує первинне збільшене зображення досліджуваного об'єкта, а окуляр забезпечує його додаткове збільшення.

Загальне збільшення мікроскопа визначають як добуток збільшення об'єктива на збільшення окуляра. Наприклад, за використання об'єктива $\times 40$ та окуляра $\times 10$ загальне збільшення становить $\times 400$.

Освітлювальна система сучасного світлового мікроскопа включає вбудоване джерело світла, конденсор та ірисову діафрагму. Конденсор концентрує світловий потік на досліджуваному препараті, а діафрагма дає змогу регулювати інтенсивність і характеристики освітлення.

Важливою характеристикою мікроскопа є **роздільна здатність** — мінімальна відстань між двома точками об'єкта, за якої вони сприймаються як окремі. Саме роздільна здатність, а не лише ступінь збільшення, визначає можливість виявлення дрібних структур досліджуваного об'єкта.

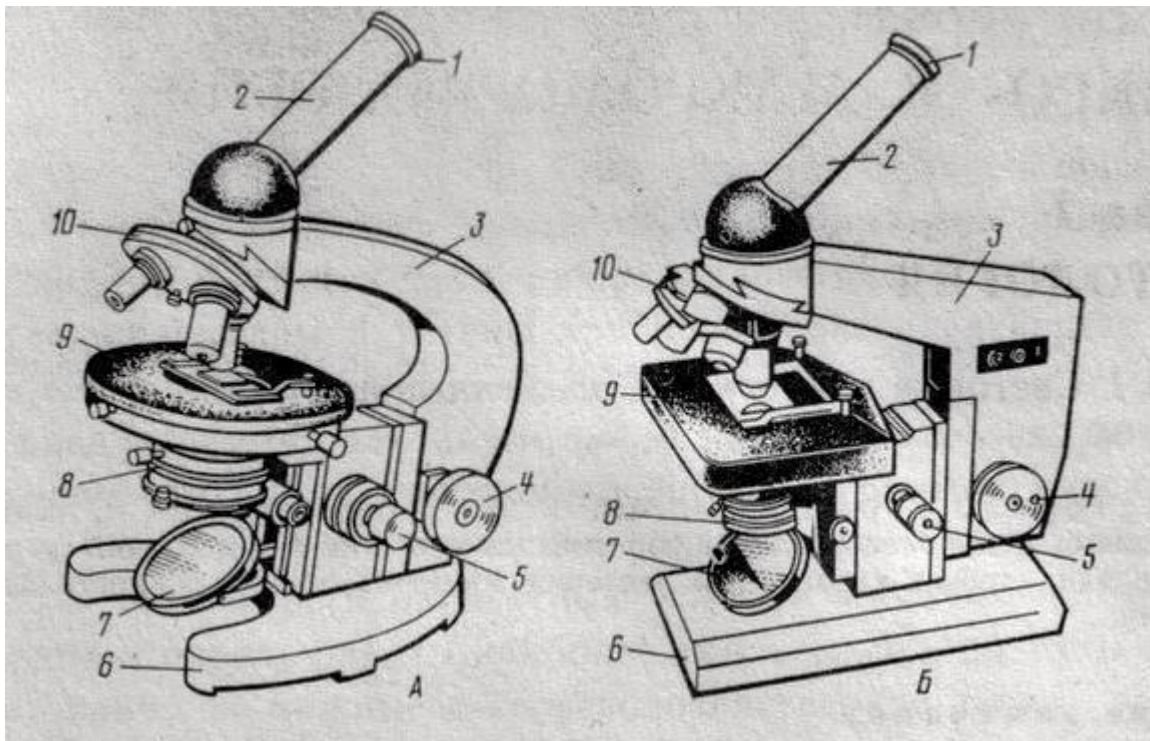


Рис. 3. Світлові мікроскопи:

А – МБР – 1, Б – Біолам: 1 – окуляр, 2 – тубус, 3 – тубусотримач, 4 – макровинт, 5 – мікро гвинт, 6 – підставка, 7 – дзеркало, 8 – конденсор та ірисова діафрагма, 9 – предметний столик, 10 – револьвер з об'єктивами

Робоча відстань – це відстань від покривного скельця до фронтальної лінзи. Для збільшення х8 вона дорівнює 13,8 мм, для х40-0,6 мм, для х90-0,12 мм.

IV. ІМЕРСІЙНА СИСТЕМА МІКРОСКОПА

Для детального дослідження бактерій та інших дрібних мікроорганізмів застосовують імерсійні об'єктиви, найчастіше зі збільшенням $\times 100$. Між фронтальною лінзою об'єктива та препаратом наносять спеціальну імерсійну олію, показник заломлення якої близький до показника заломлення скла.

Використання імерсійної олії зменшує втрати світла внаслідок заломлення та сприяє підвищенню роздільної здатності оптичної системи. Це забезпечує отримання більш чіткого зображення дрібних мікробних клітин.

Під час роботи з імерсійним об'єктивом краплю спеціальної імерсійної олії наносять на підготовлений препарат, після чого обережно переводять у робоче положення відповідний об'єктив. Остаточне фокусування здійснюють переважно за допомогою механізму точного фокусування.

Після завершення роботи залишки імерсійної олії необхідно видалити з фронтальної лінзи об'єктива спеціальним папером для очищення оптики та рекомендованим виробником засобом. Використання невідповідних розчинників може пошкодити оптичні елементи мікроскопа.

V. ПРАВИЛА РОБОТИ З ОБЛАДНАННЯМ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Під час проведення мікробіологічного аналізу необхідно дотримуватися правил безпеки, асептики та належної лабораторної практики.

1. До роботи приступають лише після ознайомлення з правилами безпечного використання відповідного обладнання.

2. У лабораторії використовують лабораторний халат та інші засоби індивідуального захисту відповідно до характеру роботи.

3. Забороняється вживати їжу та напої, зберігати харчові продукти й використовувати лабораторне обладнання не за призначенням.

4. Робоче місце до початку та після завершення роботи очищають і, за необхідності, дезінфікують відповідним засобом.

5. Перед використанням приладу перевіряють його справність та дотримуються інструкції виробника.

6. Мікробіологічні культури, реактиви та лабораторний посуд повинні бути належним чином марковані.

7. Використані матеріали та відходи збирають у спеціально призначені ємності та знезаражують або утилізують відповідно до встановлених лабораторних процедур.

8. Після закінчення роботи обладнання приводять у безпечний стан, лабораторний посуд та інструменти передають на очищення, дезінфекцію або стерилізацію відповідно до їх призначення.

9. У разі пошкодження посуду, розливу матеріалу, несправності обладнання або іншої нештатної ситуації необхідно припинити роботу та повідомити викладача або відповідального працівника лабораторії.

10. Після завершення заняття необхідно прибрати робоче місце та ретельно вимити руки.

III. РОБОТА З ІМЕРСІЙНОЮ СИСТЕМОЮ МІКРОСКОПА

При вивченні мікроорганізмів майже постійно користуються імерсійними об'єктивами, які дають велике збільшення (900-1350 разів). В цьому випадку між об'єктивом і предметним склом знаходиться кедрова олія, показник заломлення світла якої близький до показника заломлення скла, і між склом та лінзою встановлюється гомогенне середовище (скло препарату – кедрова олія – скло об'єктива). Завдяки цьому всі промені не заломлюючись, не змінюючи свого напрямку, потрапляють в об'єктив і забезпечують добру видимість найдрібніших об'єктів.

При роботі з імерсійним об'єктивом необхідно встановити дзеркало плоскою стороною і підняти конденсор. Краплину імерсійної рідини (кедрової олії) наносять на препарат так, щоб вона не розтікалась по склу.

Дивлячись збоку на предметне скло, обережно опускають тубус до поверхні краплі. Далі, дивлячись в окуляр, обережно опускають об'єктив за допомогою макровинта, слідкуючи за появою в полі зору зображення. Останнє фокусують

обертанням мікро гвинта, яким користуються протягом усього часу вивчення об'єкта. Якщо зображення нерізде, розпливчате, щось зроблено невірно: забруднена фронтальна лінза об'єктива, заважають пухирці повітря в олії, випадково закрита діафрагма, зрушена лампа або дзеркало. Причину неякісного зображення потрібно усунути.

Після завершення роботи піднімають тубус, знімають препарат і обережно протирають фронтальну лінзу об'єктива бавовняно-паперовою серветкою, змоченою очищеним бензином.

Імерсійну рідину (кедрову олію) рекомендують зберігати у спеціальних двокамерних флаконах. В одну камеру наливають ксилол або очищений бензин для очистки об'єктивів від олії, у другу – кедрову олію. Камеру з олією герметично закривають корком, в яку вставляють скляну паличку для нанесення краплини олії на препарат.

Контрольні запитання

1. Яке призначення мікробіологічної лабораторії та які основні функціональні зони вона включає?
2. Яких основних правил безпеки та організації роботи необхідно дотримуватися в мікробіологічній лабораторії?
3. Яке основне обладнання використовують для проведення мікробіологічного аналізу?
4. Яке призначення автоклава, сушильної шафи, термостата (інкубатора), центрифуги та рН-метра?
5. Які лабораторні інструменти та посуд використовують для посіву, культивування і дослідження мікроорганізмів?
6. З яких основних частин складається світловий мікроскоп та яке їх функціональне призначення?
7. Яких правил необхідно дотримуватися під час роботи зі світловим мікроскопом?
8. Що таке роздільна здатність мікроскопа та від яких чинників вона залежить?
9. З якою метою використовують імерсійну систему мікроскопа?
10. Яких правил необхідно дотримуватися під час роботи з лабораторним обладнанням і після завершення мікробіологічного аналізу?

Література:

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 312 с.
2. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 142 с.
3. Бойко А. Л. Екологія вірусів рослин / А. Л. Бойко. К.: Вища школа, 1990. 164 с.

4. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навчальний посібник / М. Д. Мельничук. К.: Поліграфконсалтинг, 2005. 320 с.
5. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, С. М. Рижук та інш. / за редакцією В. П. Поліщука / К.: Фітосоціоцентр, 2001. 220 с.
6. Гуменюк, І. І. Актуальні питання біобезпеки у сучасних умовах. У О. І. Дребот, А. І. Парфенюк (Ред.), Екологічна та біологічна безпека України: моногр. 2022. Київ: Видавництво НУБіП України. С. 238–268.
7. Левішко, А., Мазур, С., & Гуменюк, І. Оцінка мікробного ценозу ґрунтів, що зазнали впливу активних військових дій. Інноваційні екологобезпечні технології рослинництва в умовах воєнного стану. 2023. Київ: ІАП. С. 95
8. Левішко, А. С. Агрономічно корисні мікроорганізми як основа біологічної безпеки сільського господарства. У С. Т. Омельчука (Ред.), Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини. 2023. Київ: МВЦ «Медінформ». С. 125–126.
9. Віннічук Т., Коваленко О., Болоховська В. Біопрепарати проти хвороб. Пропозиція. 2013. № 4. С. 92–93.
10. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Kadmiri, I. Nitrogen fixing Azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology. Sec. Microbiotechnology*, 12. 2021.
11. Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology. Section Plant Pathogen Interactions*, 8. 2017.
12. Caracciolo, A. B., & Terenzi, V. Rhizosphere microbial communities and heavy metals. *Microorganisms*, 2021. №9(7), 1462 p.