

**ВАСИЛЬКИН В. М.
БОРЯЕВА Ю. А.
ВАСИЛЬКИН Н. В.**



ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ



Издательство Мордовского госуниверситета
Саранск 2017

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет им. Н. П. Огарева»

В. М. Василькин
Ю. А. Боряева
Н. В. Василькин

Организация работы микробиологической лаборатории

Учебное пособие
Текстовое электронное издание

Издательство Мордовского государственного университета
Саранск 2017

УДК 579.62:57.082 (075.8)

ББК Р 264

В 193

Рецензенты:

Организации работы микробиологической лаборатории

Василькин В. М.

Организация работы микробиологической лаборатории / В. М. Василькин, Ю. А. Боряева, Н. В. Василькин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2017. – 56 с.

JSBN

В учебном пособии даются рекомендации по организации микробиологических лабораторий и правилах работы в ней. Изложена краткая характеристика устройства лаборатории, необходимые приборы и оборудование.

Данное учебное пособие подготовлено применительно к вузовскому курсу для студентов всех форм обучения специальностей «Ветеринария», «Биоинженерия и биоинформатика», для студентов направления бакалавриата «Агрономия», «Зоотехния», «Биотехнология», «Биология», а также для аспирантов и преподавателей.

Кроме того, данное учебное пособие, можно использовать для организации работы научно-исследовательских и промышленных лабораторий.

УДК 582.475:665.922:620.197(075.8)

ББК НЗ

JSBN 978–5–7103 – ©

Василькин В. М.,

Боряева Ю А.,

Василькин Н. В. , 2017

© Оформление. Издательство

Мордовского университета, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	6
2. ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ	8
2.1. Общее оборудование	8
2.2. Вспомогательное оборудование и инструменты	32
3. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	41
3.1 Правила работы и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории	41
3.2. Подготовка помещений для работы с микробиологическим материалом	42
3.3. Подготовка лабораторной посуды	43
3.4. Дезинфекция и стерилизация	46
3.5. Правила работы с автоклавом	50
ГЛОССАРИЙ	52
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	54

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы повсеместно распространены в природе, что является подтверждением их значимой роли в круговороте веществ биосферы и в жизни человека. Со времен древности и до наших дней человек использует деятельность микробов в ряде производственных процессов.

Специалисту биологу необходимо знать основы микробиологии, изучающей строение, жизнедеятельность, закономерности роста и развития микроорганизмов, их взаимодействие с внешней средой.

Микроорганизмы широко используются в пищевой промышленности в технологических процессах производства различных продуктов. На основе их жизнедеятельности основано производство кисломолочных продуктов, квашенных овощей, хлеба, вина и пива. Микроорганизмы используются в получении многих биологически активных веществ: ферментов, витаминов, антибиотиков.

На фоне этого предприятие «Сигма Плюс» занимается выпуском микробиологических препаратов серии «Сигма Генезис» для применения в сельскохозяйственном производстве. Основными функциями микробиологической лаборатории предприятия «Сигма Плюс» являются выращивание чистой маточной культуры для всех направлений, обеспечение технокимического и микробиологического контроля (ТХМК) по всей технологической линии с целью своевременного устранения нарушений технологических инструкций или других недостатков и обеспечения выпуска стандартной высококачественной продукции. Также лаборатория дает рекомендации по ведению технологического процесса

Однако наряду с полезной микрофлорой существует и группа патогенных микробов – возбудителей болезней человека и животных. Многие из них являются возбудителями порчи различных пищевых продуктов. Микроорганизмы распространены повсюду, этому способствуют их разнообразные потребности в пище, легкая приспособленность к условиям существования, высокая выносливость, способность к исключительно быстрому размножению.

Для этого необходимо наряду с другими исследованиями проводить лабораторные микробиологические исследования в специальных лабораториях с соблюдением всех правил работы в микробиологических лабораториях.

Бактериологические лаборатории как структурные единицы организируются в составе областных, районных, а также в структуре зональных ветеринарных лабораторий. Они также организованы при центрах санитарно-эпидемиологического надзора, в инфекционных больницах, больницах общего типа, некоторых специализированных стационарах (например, в туберкулезных, ревматологических, кожно-венерологических), и в поликлиниках. Бактериологические лаборатории входят в состав специализированных научно-исследовательских учреждений.

1. УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

При подборе оборудования для оснащения микробиологической лаборатории руководствуются нормативными документами:

ГОСТ Р 51446-99. Пищевые продукты. Общие правила микробиологических исследований;

ГОСТ ISO 7218-2011. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры (с Изменениями N 1-4)

Специфика микробиологических работ требует, чтобы помещение, отведенное под лабораторию, было изолировано от жилых комнат, пищевых блоков и других непрофильных производственных помещений.

Помещения микробиологических лабораторий по степени опасности для персонала разделяются на 2 зоны:

I. «Заразная» зона - помещение или группа помещений лаборатории, где осуществляются манипуляции с патогенными биологическими агентами и их хранение, персонал одет в соответствующий тип защитной одежды.

II. «Чистая» зона - помещения, где не проводят работу с биологическим материалом, персонал одет в личную одежду.

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Основные требования при устройстве лаборатории:

- 1) полное изолирование от других помещений;
- 2) защита от воздействия факторов окружающей среды (пыль, вода, шум, вибрация и т.д.);
- 3) должна быть предусмотрена возможность зонирования помещения (для каждого этапа проведения исследования свое место, от приема образцов до их последующей утилизации, после окончания работ).

Под лабораторные комнаты отводят наиболее светлые, просторные помещения, естественная освещенность которых должна составлять не менее 100 лк (люкс). Стены в этих комнатах на высоту 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской или покрывают кафелем. Пол застилают линолеумом. Такого рода отделка позволяет пользоваться при уборке помещения дезинфицирующими растворами.

В каждой комнате должна быть раковина с водопроводной подводкой и полкой для бутылки с дезинфицирующим раствором.

Во всех помещениях лаборатории должна быть предусмотрена приточно-вытяжная вентиляция, с фильтрами тонкой очистки для трехкратного обмена воздуха в сутки, подведена водопроводная вода и обеспечен хороший сток.

В каждой лаборатории предусмотрены:

– микробиологический бокс – изолированное помещение с тамбуром (предбоксом) для выполнения работ в асептических условиях. В боксе ставят стол для посевов, табурет, над рабочим местом монтируют бактерицидные лампы.

– средоварная – помещение для приготовления и хранения питательных сред;

– стерилизационные – помещения для стерилизации питательных сред, растворов, посуды;

– препараторская – помещение для подготовки лабораторной посуды, ватно-марлевых пробок и т. д.;

– лабораторные комнаты для микробиологических исследований;

– моечная, оборудованная для мытья посуды;

- виварий для содержания подопытных животных.

Рекомендуемая схема размещения помещений лаборатории, используемой при работе с микроорганизмами представлены на рис. 1.

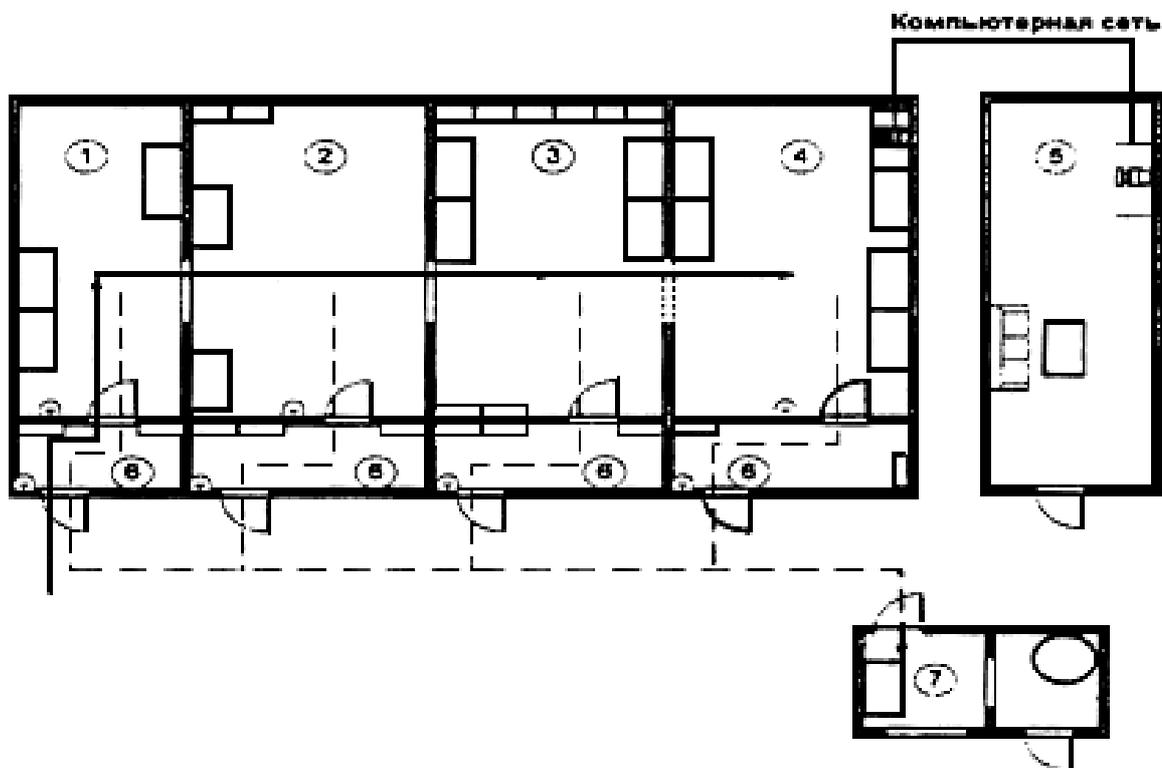


Рисунок 1 – Рекомендуемая схема размещения помещений (рабочих зон) лаборатории:

1–4 – рабочие зоны; 5 – вспомогательное помещение (комната анализа результатов); 6 – предбоксик; 7 – вспомогательное помещение (комната обеззараживания материала с автоклавом).

2. ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторное помещение оборудуется столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения необходимой при работе аппаратуры, посуды, красок и реактивов. В лабораторной комнате должно быть место для окраски микроскопических препаратов, где должны храниться растворы красок, спирт, кислоты, фильтровальная бумага и пр. Каждое рабочее место должно быть снабжено газовой горелкой или спиртовкой и банкой с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами и другими лабораторными материалами.

2.1. Общее оборудование

Обязательно наличие в помещении микробиологической лаборатории **ламинарного бокса**, который используется для посевов и пересевов микроорганизмов в стерильных условиях. Эта установка для удаления пыли и других частиц снабжается вертикальным или горизонтальным потоком воздуха, и представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха (рис. 2).

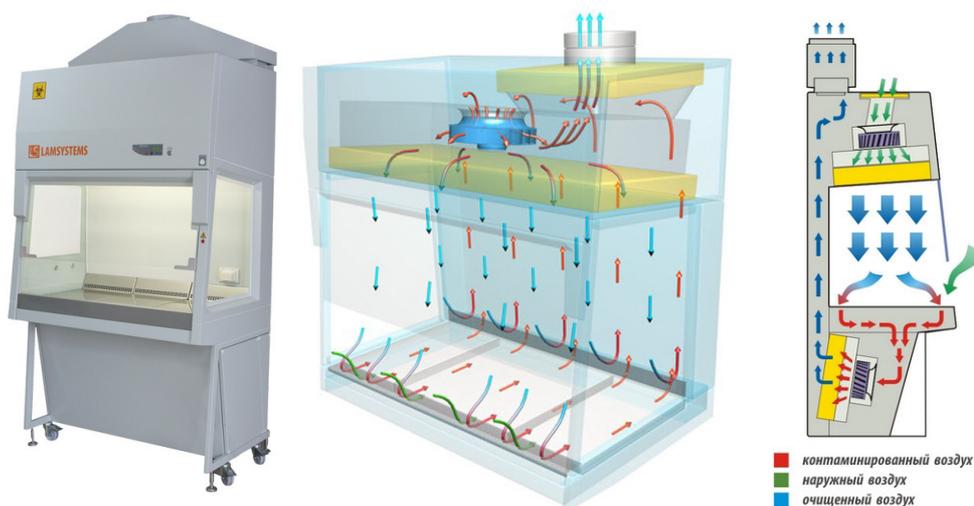


Рисунок 2 – Ламинаторный бокс
а – внешний вид; б – схема движения воздуха
(общий вид и вид с боку).

Весы аналитические и лабораторные используются для взвешивания образцов проб, питательных сред, аналитических фильтров (при бактериологическом анализе воздуха), реактивов (рис. 3). Весы желательно располагать на устойчивом основании или на специальном весовом столе. Выбор весов, строго заказчика не обязывает, но с точки зрения удобства и безопасности, особенно при работе с патогенными микроорганизмами вы-

соких классов опасности, не лишним будет такая сервисная возможность как «бесконтактное управление работой весов». Эта функция доступна моделям весов фирм Ohaus или Mettler Toledo.



Рисунок 3 – Весы лабораторные фирмы Mettler Toledo
(<http://techob.ru>)

Гомогенизаторы применяют для измельчения испытуемых проб в различных объемах. В пробирках, в том числе одноразовых, при работе с инфицированными образцами, в иных объемах, с различными типами роторов, гомогенизаторы лопаточного типа.

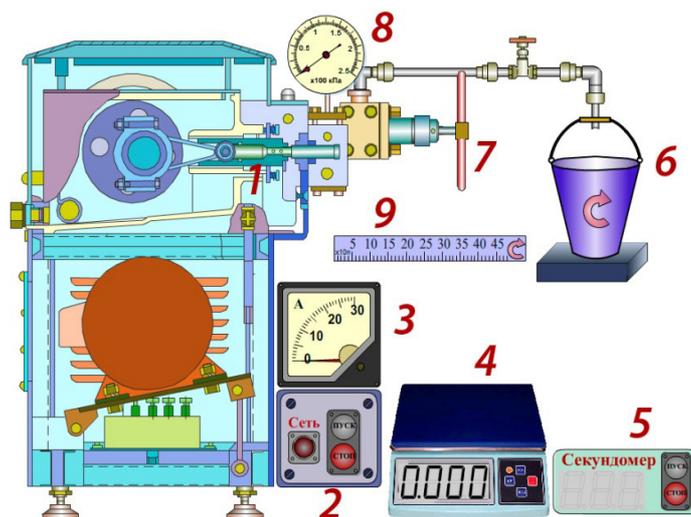


Рисунок 4 – Интерфейс гомогенизатора: 1 – гомогенизирующая головка; 2 – кнопка «Пуск»; 3 – амперметр; 4 – весы; 5 – секундомер; 6 – емкость; 7 – рукоятка; 8 – манометр; 9 – линейка;
(<http://5fan.ru>)

Для измерения pH приготовляемой питательной среды или непосредственно пробы используется **pH-метр**. Подойдет практически любой

прибор, из имеющихся на рынке, при этом точность измерения должна быть не ниже $\pm 0,1$ рН (рис. 5).



Рисунок 5 – рН-метры фирмы Mettler Toledo (<https://www.chromservis.eu>)

Автоклав – стерилизация горячим паром под давлением, при температуре не ниже $+121$ °С (рис. 6). Используется для уничтожения микроорганизмов, при стерилизации посуды инструментов, в некоторых случаях для обеззараживания отходов.



Рисунок 6 – Автоклав (<http://laboboz.files.wordpress.com>)

Это герметичный котел с двойными металлическими стенками и крышкой. Пространство между стенками (водопаровая камера) заполняется водой. Внутренняя часть (стерилизационная камера) снабжена манометром, предохранительными клапанами и краном для спуска воды и пара. Для создания герметичности автоклав плотно закрывается крышкой с резиновой прокладкой. Применяют для стерилизации питательных сред под давлением от 0,5 до 1,0 МПа в течение 20–30 мин.

Термостаты, которые бывают суховоздушными и водяными, применяются для поддержания постоянства температуры при выращивании культур микроорганизмов. Оптимальная температура для размножения многих микроорганизмов – 37 °С.

Если температура окружающего воздуха выше, чем необходимо выдерживать в камере, например, летом, в жарком климате, то может понадобиться термостат с охлаждением. В работе необходим для обеспечения некоторых методик выполнения измерений (МВИ) для выдерживания питательных сред, растворов.



Рисунок 7 – Термостат
(<http://importantevents24.com>)

Холодильник – необходим для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, реактивов, а также проб образцов, в течение, оговоренного в нормативных документах срока (рис. 10). В некоторых случаях, для тех же целей, может понадобиться морозильная камера, с температурой не выше –18 °С.



Рисунок 8 – Холодильник для микробиологической лаборатории
(<http://www.medicalexpo.com>)

Водяная баня – для поддержания заданной температуры в помещенных в резервуар бани, лабораторных емкостях (колбы, чашки, сосуды), необходима для обеспечения технологического процесса при подготовке сред и суспензий.



Рисунок 9 – Водяная баня для микробиологической лаборатории
(<http://www.ssci-ltd.ru>)

Сушильный шкаф (печь Пастера) используют для стерилизации сухим жаром посуды, инвентаря и сухих материалов, например, крахмала, мела. Стерилизуемый материал предварительно заворачивают в бумагу и помещают в шкаф так, чтобы он не касался стенок (рис. 12). Стерилизацию проводят при температуре 160°C в течение двух часов или при температуре 180 °С в течение часа. Поднимать температуру выше 180°C не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими). Простерилизованный материал вынимают после отключения и охлаждения шкафа, лучше, когда температура в шкафу сравняется с комнатной.

Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительное время стерилизации; при использовании сухого жара более высокие температуры (выше 170 °С) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги. Кроме того, если нет циркуляции воздуха, может происходить образование слоев воздуха с разными температурами.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

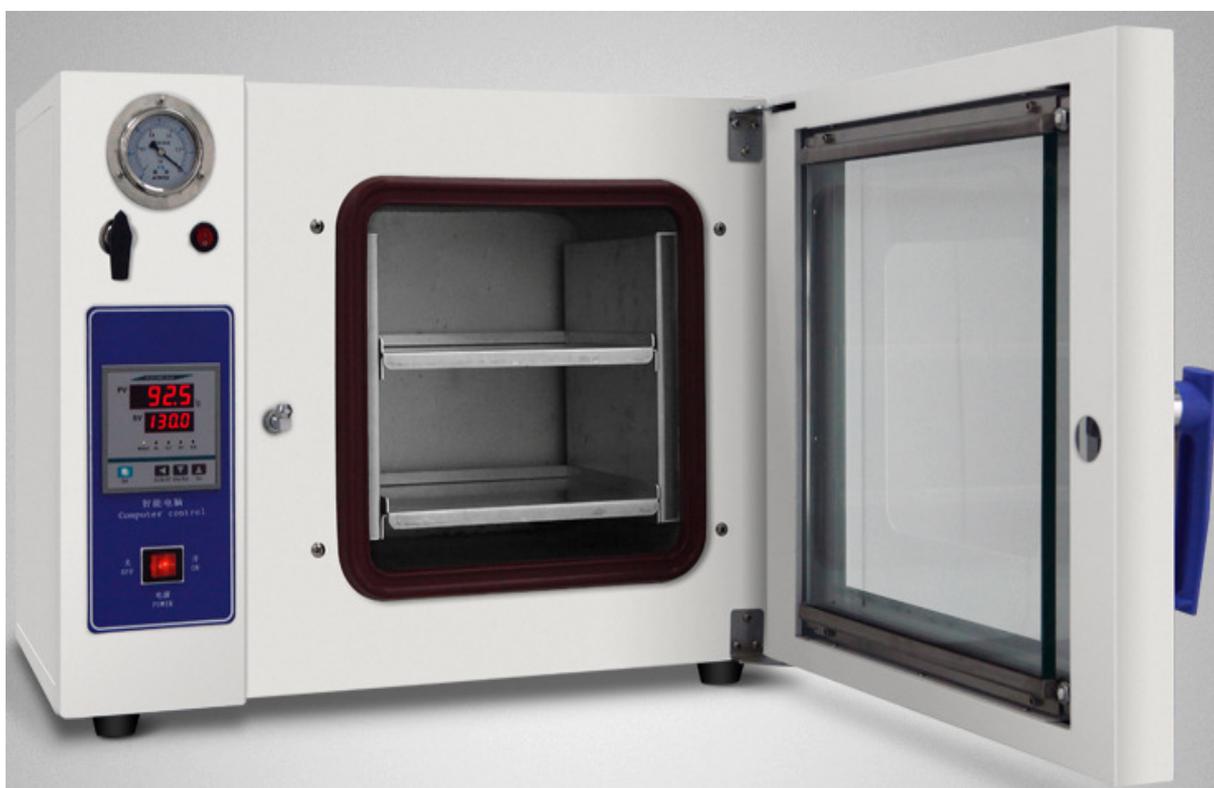


Рисунок 10 – Сушильный шкаф для стерилизации сухим горячим
(<https://biosan.lv>)

CO₂-инкубатор – для поддержания заданной температуры и влажности в газовой среде, для предотвращения контаминации микроорганизмов.



Рисунок 11 – CO₂-инкубатор
(<http://www.parallabs.com>)

Дистиллятор – для получения дистиллированной воды. Для приготовления растворов, суспензий, разбавления реактивов.



Рисунок 12 – Дистиллятор
(<http://ad-torg.ru/tzmoi/de-4>)

Фильтровальная установка – для отбора проб воды на различные фильтры, для последующего анализа.



Рисунок 13 – Прибор вакуумного фильтрования ПВФ (<http://analytic-lab.ru>)

Аспиратор – для отбора проб воздуха. Для микробиологического анализа подойдет модель аспиратора ПУ-1Б, с фиксированным объемом прокачиваемого воздуха, с осаждением на чашку Петри.



Рисунок 14 – Сильфонный аспиратор АМ-5Е / АМ-5 / АМ-5М (внешний вид и в разрезе) (<http://magazinlab.ru>)

Центрифуги применяются для осаждения микроорганизмов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии). В основе метода центрифугирования лежит принцип отделения крупных частиц с большей плотностью при низких скоростях. При повышении скорости центрифуг можно осадить все более мелкие частицы (рис. 15).



Рисунок 15 – Центрифуга лабораторная
(<http://www.dnpp.biz>)

Микробиологического анализатора БакТрак 4300 автоматически регистрирует рост широкого спектра микроорганизмов (рис. 16). Простая подготовка образцов к исследованию на бактериологическом анализаторе в сочетании с исключением рутинных стадий метода подсчета колоний на чашках позволяет значительно увеличить количество проводимых анализов в лаборатории. Компьютерная программа анализатора работает на операционной системе WINDOWS. Программа позволяет решить широкий спектр задач современной микробиологической лаборатории.

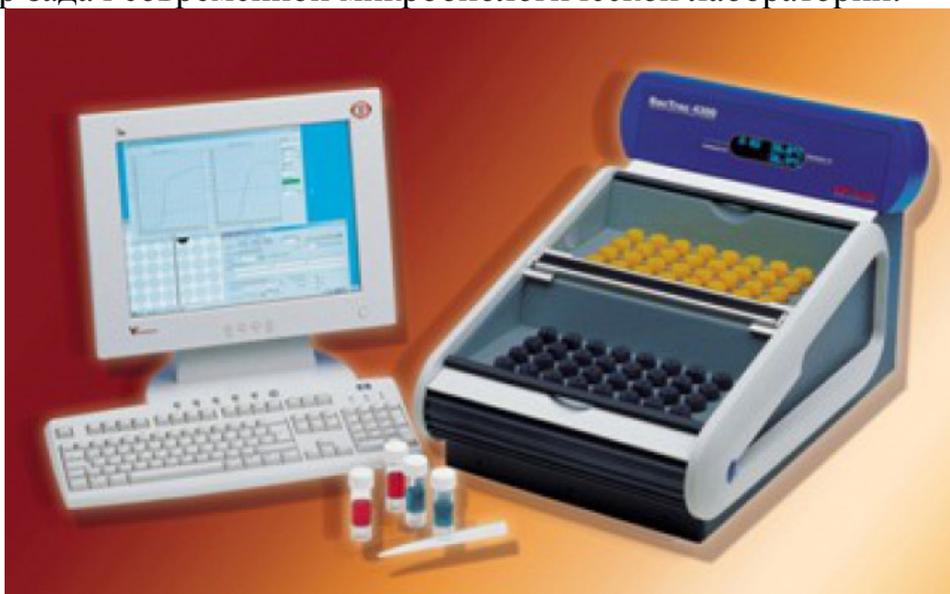


Рисунок 16 – Микробиологический анализатор Бактрак – 4300
(<http://sy-lab.ru>)

Аппарат Коха применяют для стерилизации питательных сред, разрушающихся при температуре выше 100 °С (Рис. 17).

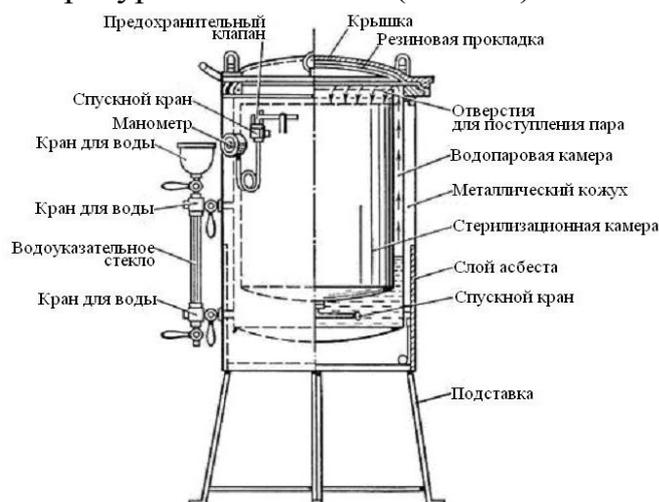


Рисунок 17 – Аппарат Коха
(<http://sredovarka.ucoz.com>)

Он представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном и конусообразной крышкой, которая имеет отверстие для выхода пара. Аппарат покрыт теплоизолирующим материалом (асбестом или линолеумом). Сосуды с питательными средами ставят на подставку с отверстиями, находящуюся внутри аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта их с паром. Обработка стерилизуемого материала в аппарате Коха производится в течение трех дней по 30 мин ежедневно. В перерывах между стерилизацией среду помещают на двадцать четыре часа в термостат при 28–30 °С.

Средоварка применяется для приготовления питательных сред при культивировании микроорганизмов. В последнее время гнашли широкое применение автоматические средоварки.

Средоварки автоматические Mediaclave INTEGRA (рис. 18) полностью приспособлены для быстрой подготовки питательных сред из сухих порошков с соблюдением температурного режима и давления. При созданных герметичных условиях возрастает плодовитость культуральной среды, происходит стерилизация готового продукта и быстрое охлаждение без потери свойств и питательности.

Каждая средоварка оборудована нагревательными элементами, бесконтактной системой охлаждения и электродвигателем для работы магнитной мешалки, осуществляющей перемешивание среды. Аппарат обеспечен несколькими системами контроля проведения процесса, что гарантирует приготовление живой и готовой к использованию среды.

С помощью средоварки можно приготовить: бульон для выращивания кишечной палочки, соевый, кровяной, шоколадный, пептонный агар и растворы Мак-конки и Сабуро.

Для розлива готовой питательной среды предусматривается полностью совместимый со средоварками аппарат MediaJet – наполнитель для чашек Петри.

Установка параметров и процесс контролируется с панели управления. Оптимальное поддержание условий подготовки среды несколькими системами контроля гарантирует производство качественного продукта.



Рисунок 18 – Средоварка автоматическая INTEGRA MEDIACLAVE (<http://sredovarka.ucoz.com>)

Микроскоп – для исследования культур микроорганизмов, их морфологии. Требуется бинокулярный микроскоп с достаточно высоким увеличением (рис. 19). Идеальным для микробиологической лаборатории будет микроскоп с наличием конденсора темного поля фазово-контрастного устройства. Стереомикроскопы, с небольшим увеличением, в свою очередь будут удобны для изучения колоний бактерий, в питательной среде.

С помощью светового микроскопа изучают морфологию и строение клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах. С помощью электронного микроскопа в микробиологии исследуют субмикроскопическое строение клеток микроорганизмов, выявляют неизвестные ранее формы мельчайших микроорганизмов, ведут их учет.



Рисунок 19 – Микроскоп поляризационный лабораторный тринокулярный «BinaLogic 6XB-PC»
(<http://www.binalogic.kz>)

Устройство и работа светового микроскопа. В микробиологической практике применяют световые микроскопы отечественных марок: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, Биолам Р-1 и др. Они предназначены для изучения формы, структуры, размеров и других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2–0,3 мкм. Световой микроскоп состоит из двух частей – оптической и механической (рис. 20). К механической части относятся штатив, предметный столик, тубус.

Штатив состоит из основания и неподвижно привинченного тубусодержателя. К штативу примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции движения тубуса. Система приводится в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки на препарате. При вращении винтов по часовой стрелке тубус движется по направлению к препарату; при вращении против часовой стрелки – от препарата.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик может перемещаться с помощью винтов в горизонтальной плоскости. В центре столика находится круглое отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. На столике смонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. В верхний конец тубуса вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы.

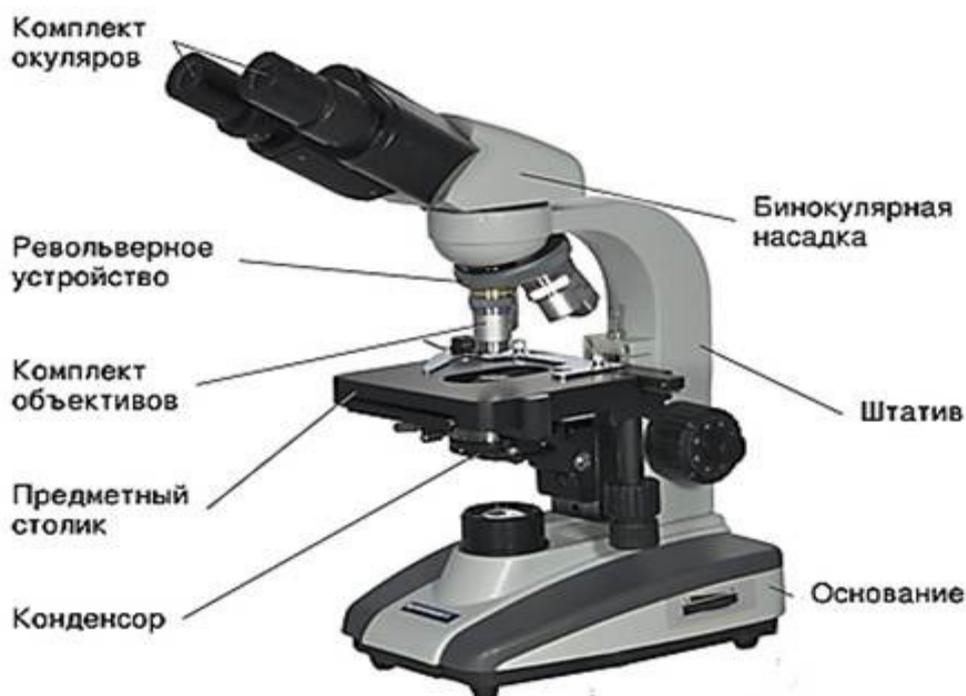


Рисунок 20 – Основные части светового микроскопа

Конденсор представляет собой оптическую систему из двух-трех короткофокусных линз для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Конденсор концентрирует лучи, идущие от плоского зеркала, и направляет их под большим углом на объект. Линзы конденсора вмонтированы в цилиндрическую оправу, соединяющуюся с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз вдоль оси микроскопа специальным винтом. При опускании конденсора поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии – освещается. Для регулировки интенсивности освещения конденсор снабжен ирисовой (лепестковой) диафрагмой, состоящей из тонких непрозрачных серповидных пластинок. При передвижении рычага диафрагмы, расположенного в нижней части оправы конденсора, пластинки можно сдвигать и раздвигать, плавно меняя диаметр действующего отверстия. У многих современных видов микроскопов конденсор и источник света вмонтированы в микроскоп.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) вставляется в верхний конец тубуса. Окуляр представляет собой систему двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклостью в сторону объектива. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, а обращенная к препарату – полевой, или собирающей. Назначение полевой линзы - собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы. Глазная линза, подобно простой лупе, увеличивает действительное

изображение, даваемое объективом. Расстояние между линзами равно сумме их фокусных расстояний (рис. 21).

Назначение окуляра состоит в прямом мнимом увеличении того действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Окуляры помечаются цифрами, показывающими их собственное увеличение $\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около $\times 1,5$) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах от 55 до 75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

Основные технические характеристики микроскопа. Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

Объективы (от греч. *objectum* – предмет исследования) являются наиболее важной частью микроскопа, от их качества зависит, в основном, изображение объекта. Они ввинчиваются в гнезда револьвера и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя, или фронтальная, линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения и называются коррекционными.

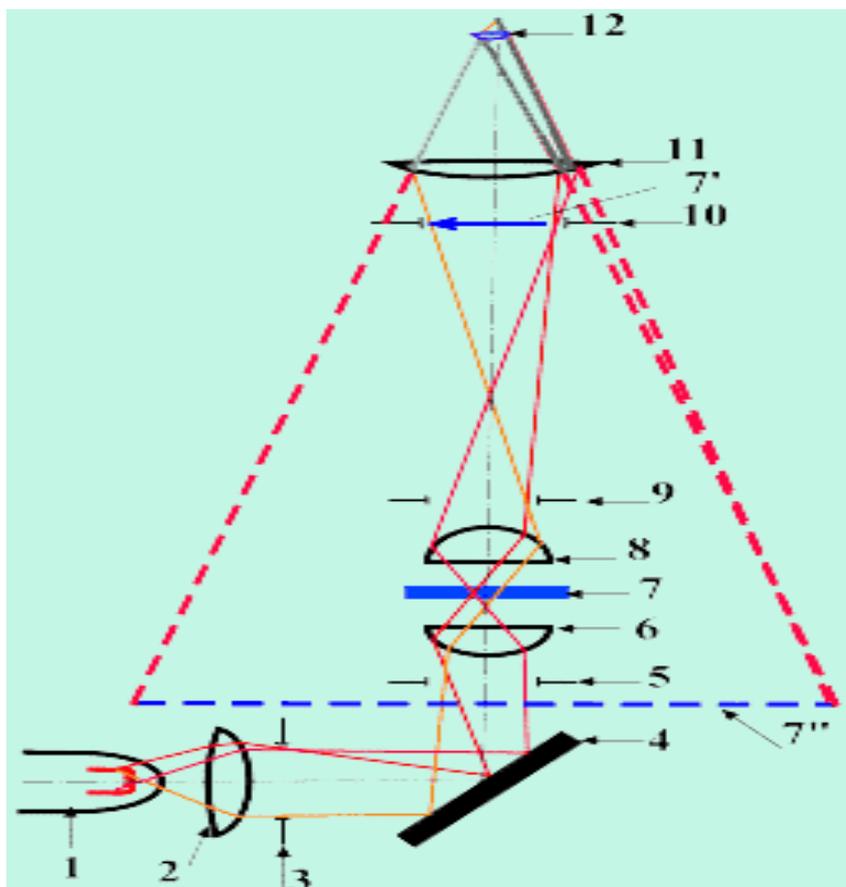


Рисунок 21 – Схема лучей при работе с микроскопом

1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – ирисовая полевая диафрагма; 4 – зеркало; 5 – ирисовая апертурная диафрагма; 6 – конденсор; 7 – препарат; 7' – увеличенное действительное промежуточное изображение препарата, образуемое объективом; 7'' – увеличенное мнимое окончательное изображение препарата, наблюдаемое в окуляре; 8 – объектив; 9 – выходной значок объектива; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – окуляр; 12 – глаз.

Объективы подразделяются на **сухие и иммерсионные**. При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. В случаях использования иммерсионных объективов между фронтальной линзой объектива и объектом исследования должна находиться жидкость с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Лучшим для этой цели является иммерсионное масло (кедровое) с коэффициентом преломления 1,515 (коэффициент преломления стекла 1,52).

В качестве заменителей кедрового масла можно использовать персиковое масло ($n = 1,471-1,498$), смесь касторового и укропного масел ($n = 1,474-1,498$) и др. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще применяют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу. Благодаря этому, световые лучи при переходе из стекла в слой кедрового масла не преломляются (так как остаются по существу в оптически однородной гомогенной среде) и, не отражаясь, попадают в объектив (рис. 22). В микроскопах МБР-1 и МБИ-1 два сухих объектива с увеличением $\times 8$, $\times 40$ и один иммерсионный с увеличением $\times 90$. Данные о каждом объективе имеются на его оправе: а) $\times 8$, $\times 40$, $\times 90$; б) числовая апертура (характеризует светособирательную способность объектива); в) заводской номер.

Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы $\times 90$ имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или масляная иммерсия), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

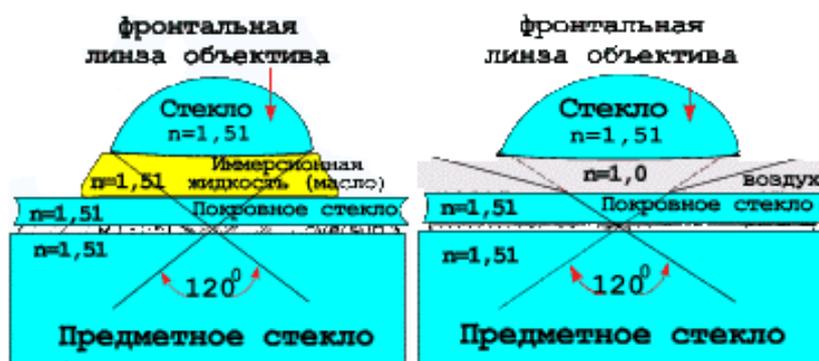


Рисунок 22 – Ход лучей в сухой и иммерсионной системах: I–V – лучи света.

Увеличительная способность микроскопа. Коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра K на увеличение объектива V и выражается формулой

$$D = KV \quad (1)$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение в 2000 и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают $\times 1400$. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500–1000 раз. Например, для объектива с увеличением $\times 40$, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет $\times 325$ –650. С помощью этого увеличения можно различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива $\times 40$ следует брать окуляр $\times 1,5$, чтобы получить увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Хуже того, повышение увеличения окуляра приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и к возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение $\times 90$ (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно $\times 1250$. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличениями более $\times 15$, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения.

Бесполезные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения, если при этом не требуется рассмотрение их структуры.

Разрешающая способность микроскопа. Четкость получаемого изображения характеризуется разрешающей способностью микроскопа. Эта характеристика микроскопа особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Под разрешающей способностью микроскопа понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они ещё не сливаются в одну (видимые раздельно). Таким образом, чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины можно увидеть объект.

Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность зависит от длины волны используемого света и суммы числовых апертур объектива и конденсора и вычисляется по формуле:

$$\alpha = \gamma / (A_1 + A_2), \quad (2)$$

где γ – длина волны используемого света; A_1 – числовая апертура объектива; A_2 – числовая апертура конденсора.

При определении разрешающей способности микроскопа следует различать два случая: освещение прямое (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа) и косое. При косом освещении разрешающая способность α в два раза меньше, чем при прямом

$$\alpha = \gamma 2(A_1 + A_2), \quad (3)$$

Для условий работы микроскопов величина γ постоянна, так как объекты исследуются при обычном свете ($\gamma = 0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности зависит исключительно от возможности повышения числовой апертуры A .

Числовая апертура объектива характеризует светособирательную способность его и определяется по формуле:

$$A = n \sin u, \quad (3)$$

где n – показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду, находящуюся между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; $\sin u$ половина отверстного угла α .

Основные правила работы с микроскопом. Место для микроскопа выбирается подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз.

Рекомендуется смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируется расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно. Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой – основание микроскопа. Наклонять микроскоп в сторону нельзя, так как при этом окуляр может выпасть из тубуса.

Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот и щелочей. Нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче. Микроскоп следует оберегать от пыли, сырости и хранить в футляре под стеклянным колпаком или покрывать материей.

При микроскопии препаратов с **сухим объективом** следует придерживаться определенного порядка в работе:

а) микроскоп размещают на рабочем столе тубусодержателем к себе на расстоянии 3-5 см от края стола;

б) ставят объектив с малым увеличением ($\times 8$) и при этом увеличении устанавливают наилучшее освещение; наилучшее освещение достигается при регулировке положения зеркала, конденсора и диафрагмы; при просмотре неокрашенных препаратов применяют суженную диафрагму и опущенный конденсор, при наблюдении окрашенных препаратов - открытую диафрагму и поднятый конденсор. Поле зрения микроскопа при правильной установке света будет иметь форму круга, хорошо и равномерно освещенного;

в) помещают препарат на предметный столик микроскопа, под объектив, и укрепляют зажимами;

г) опускают объектив ($\times 8$) вниз при помощи макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, на расстояние около 0,5 см от предметного столика;

д) глядя в окуляр, медленно вращают макровинт на себя и поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого объекта. После этого, вращением микрометрического винта фокусируют объектив так, чтобы изображение предмета было четким. Микрометрический винт во избежание порчи винтовой нарезки можно вращать не более чем на впол оборота в ту или другую сторону;

е) повернув револьвер, устанавливают объектив со средним увеличением ($\times 20$; $\times 40$; $\times 60$);

ж) после окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив $\times 8$, мягкой тканью протереть микроскоп и убрать его в футляр.

При работе с **иммерсионным объективом** необходимо соблюдать следующие правила и порядок работы:

а) установить зеркало плоской стороной, поднять конденсор и под малым увеличением микроскопа (объектив $\times 8$) настроить свет;

б) на приготовленный и окрашенный мазок нанести небольшую каплю иммерсионного масла (не размазывая по стеклу) и поместить препарат на предметный столик;

в) повернуть револьвер до отметки иммерсионного объектива $\times 90$;

г) осторожно опустить тубус микроскопа до погружения фронтальной линзы иммерсионного объектива в каплю масла, при этом наблюдая сбоку;

д) глядя в окуляр микроскопа и действуя макровинтом, медленно поднять тубус микроскопа до появления в поле зрения изучаемого объекта;

е) провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его в пределах только одного оборота;

ж) по окончании микроскопирования поднимают тубус, опускают конденсор, переводят револьвер на малый сухой объектив $\times 8$, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива $\times 90$ сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином или спиртом.

Различные методы микроскопии. Кроме светооптической микроскопии к методам микроскопии относят: темнопольную, фазово-контрастную, люминесцентную и электронную микроскопии.

Темнопольная микроскопия. Метод наблюдения в темном поле, разработанный австрийским ученым Зигмонди, дает возможность повысить разрешающую способность микроскопа в 10 раз. В основе метода лежит явление Тиндаля – освещение объекта косыми лучами света. Эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Тогда наблюдатель видит в темном поле интенсивно светящиеся объекты, поскольку лучи света идут именно от них.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным (центральная часть, которого затемнена так, что прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают) и применив для освещения источник сильного света. Объект освещается косыми боковыми лучами, и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в том случае, если апертура конденсора превышает на 0,2–0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуется конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой от 0,65 до 0,85.

Метод используется с целью исследования живых клеток микроорганизмов. При темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне. При этом могут быть обнаружены мельчайшие организмы, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Однако темнопольная микроскопия позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучить его внутреннюю структуру. С помощью темнопольной микроскопии изучают препараты типа «раздавленная капля». Предметные стекла должны быть не толще 1,1–1,2 мм, покровные – 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц (эти дефекты будут видны ярко светящимися и не позволят наблюдать препарат).

Темнопольную микроскопию также возможно использовать для функционально-морфологического изучения крупных объектов типа дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) слабо и равномерно опалесцирует. На ее фоне четко различаются черные оптически пустые вакуоли. Капли жира выделяются как сильно блестящие гранулы. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

Фазово-контрастная микроскопия. Человеческий глаз выявляет только различия в длине (цвете) и амплитуде (интенсивности, контрастности) световой волны, но не улавливает различий в фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через живую клетку, не меняют своей амплитуды, хотя и изменяются по фазе.

Превратить фазовый (неконтрастный) препарат в «амплитудный» (контрастный) можно, либо окрашивая объект (для живых клеток этот прием малопригоден), либо снижая апертуру конденсора путем прикрывания диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижается разрешающая способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии, предложенный голландским физиком Цернике для наблюдения за прозрачными объектами, основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью специального оптического устройства. Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск - фазовую пластинку с кольцом, а в конденсор - кольцевую диафрагму (непроницаемую для лучей света пластинку, в которой имеется прозрачная щель в виде кольца), так чтобы через конденсор и объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы проходящего светового луча сдвигаются и можно наблюдать эффект фазового контраста.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (рис. 23), которое состоит из фазовых объективов, конденсоров с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

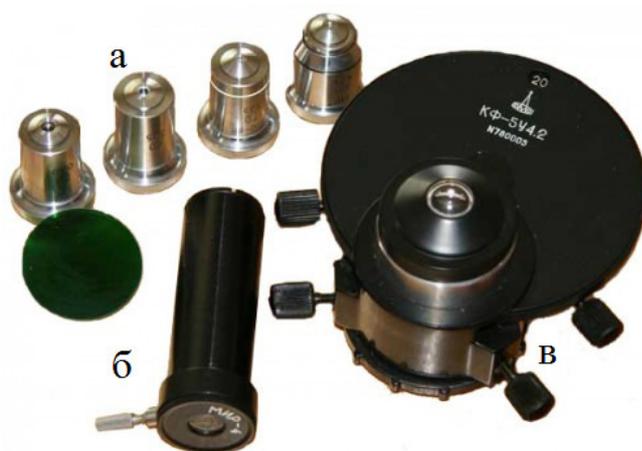


Рисунок 23 – Фазово-контрастное устройство

а – фазовые объективы; *б* - вспомогательный микроскоп; *в* – фазовый конденсор

Метод применяют для исследования живых клеток микроорганиз-

мов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в физиологические процессы изучаемых объектов.

Благодаря применению этого способа микроскопии, контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается, и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст). Фазовоконтрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики - так называемые инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху.

За изобретение фазово-контрастной микроскопии его автор - физик Цернике – был удостоен Нобелевской премии.

Люминесцентная микроскопия. Этот метод применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. Люминесценция (или флюоресценция) – это явление, когда некоторые вещества под влиянием падающего на них света испускают лучи с другой (обычно большей) длиной волны.

Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной (светиться желто-зеленым или оранжевым светом). Это так называемая *собственная (первичная)* люминесценция, которая наблюдается без предварительного окрашивания объекта.

Установка для люминесцентной микроскопии в видимых лучах состоит из яркого источника света и биологического микроскопа (рис. 24).



Рисунок 24 – Люминесцентный микроскоп Микромед 3 ЛЮМ LED
(<https://micromed.pro>)

Вторичная (наведенная) люминесценция возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями – флюорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, конго красным, тетрациклином, хинином). Препараты, окрашенные флюорохромами, изучают в средах, не люминесцирующих под действием коротковолновых лучей, – в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе. Флюорохромы связываются с нуклеиновыми кислотами или белками и образуют прочные комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветом. Сила их света бывает различной, но чаще всего она невелика, поэтому люминесцентную микроскопию следует проводить в затемненном помещении.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычными методами заключаются:

- в сочетании цветного изображения и контрастности объектов;
- в возможности изучения морфологии живых и убитых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- в исследовании клеточных микроструктур, избирательно поглощающих различные флюорохромы, которые являются при этом как бы специфическими цитохимическими индикаторами;
- в изучении функционально-морфологических изменений клеток;
- в использовании флюорохромов при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют в ацетоне или этаноле 5–10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15–20 мин, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два светофильтра: первый задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца, обработанного флюорохромом; второй пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом и воспринимаемый глазом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра.

Электронная микроскопия. Позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически составляющая от 0,1 до 0,2 нм, позволяет получать общее полезное увеличение до 1000000 раз.

Устройство электронного микроскопа в принципе аналогично световому микроскопу, но роль световых лучей в электронном микроскопе играет пучок электронов, излучаемых специальным источником –

электронной пушкой. Электроны попадают в магнитную конденсорную линзу. Использовать стеклянные линзы или зеркала для фокусировки электронов нельзя, так как стекло непроницаемо для электронов. В электронном микроскопе роль линз выполняет круговое магнитное поле, под действием которого электроны могут отклоняться или центрироваться. Функция конденсорной линзы электронного микроскопа аналогична выполняемой конденсором обычного микроскопа – сведение пучка электронов в одной точке на объекте. Пройдя через объект, электроны попадают в объектную линзу, которая вновь фокусирует расходящийся пучок и дает первое промежуточное изображение объекта. Магнитный проектор (проекционная линза, аналогичная по функции линзе окуляра) дает окончательное увеличение изображения объекта на флюоресцирующем экране - металлической пластинке, покрытой тонким слоем сернистого цинка или минерала виллемита. При попадании на экран электронных лучей каждая частица этого слоя начинает светиться; замещая экран фотографической пластинкой, изображение объекта можно сфотографировать.

На сегодняшний день электронные микроскопы бывают трех видов: *трансмиссионные (просвечивающие), сканирующие и электронные микроскопы высокого напряжения*. В последних большое ускорение электронов позволяет им проходить через сравнительно толстые срезы (1–5 мкм), при этом получают трехмерное изображение структур, что облегчает изучение объекта. Разрешающая поверхность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего типа».

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ, transmission electron microscopy) похожа на наблюдение за окрашенными клетками при световой микроскопии в светлом поле (рис. 25).



Рисунок 25 – Трансмиссионный электронный микроскоп (<http://www.extremetech.com>)

Исследуемые образцы фиксируются и «красятся» солями тяжелых металлов, которые обеспечивают контраст. Контраст достигается за счет поглощения исследуемым образцом пучка фокусированных электронов; пучок проходит сквозь образец и фокусируется с образованием картинки на флуоресцентном экране.

Электроны, которые сталкиваются с ионами тяжелых металлов пока они проходят через образцы, отклоняются и не попадают на конечную картинку. Поэтому эти области образца кажутся темными. Предел разрешения 0,1 нм.

Другой тип электронной микроскопии – *сканирующий (SEM, scanning electron microscopy)*, обеспечивает рельефное изображение поверхности объекта и используется для получения трехмерных изображений клеток (рис. 26). При этом пучки электронов не проходят через образец, а пробегают по его поверхности. Поверхность клеток покрывается тонким слоем испаренного тяжелого металла (чаще всего золото), а поток электронов отражается от этого слоя. Электроны, которые рассеиваются или излучаются от поверхности образца, собираются для образования трехмерного изображения по мере прохождения пучка электронов через клетки. Предел разрешения около 10 нм (сейчас уже появились 3–5 нм), увеличение – 300000. Его обычно используют для изучения клеток, а не субклеточных органелл или макромолекул.



Рисунок 26 – Сканирующий электронный микроскоп
(<http://infokanal55.ru>)

Кроме того, существуют комбинированные электронные микроскопы, которые могут работать в просвечивающем, сканирующем, либо в двух режимах одновременно. Электронная микроскопия позволяет изучить

структуру микроорганизмов на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки, на которые нанесена тончайшая целлюлозная или пластмассовая пленка - подложка, так как стекло непроницаемо для электронов. Исследуемый объект максимально очищают от посторонних примесей и наносят на пленку-подложку. Для увеличения контрастности объекта проводят его напыление тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) в виде паров или проводят обработку контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовая кислота).

2.2. Вспомогательное оборудование и инструменты

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри (рис. 27).

В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных культур заполняют обычно 1/3 пробирки, для анаэробных – 2/3. При выращивании микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды. Для культивирования аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для выращивания анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на 2/3.

Пробирки и колбы также используют для хранения питательных сред. Чашки Петри применяют для выращивания культур микроорганизмов на плотных питательных средах. Они имеют высоту около 1,5 см и

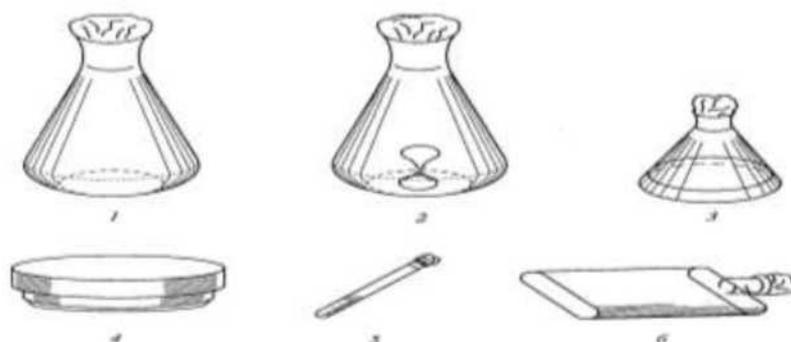


Рисунок 27 – Посуда для культивирования микроорганизмов: 1 – качалочная колба; 2 – качалочная колба с отбойниками; 3 – коническая колба; 4 – чашка Петри; 5 – пробирка; 6 – матрас.

диаметр около 8–10 см (диаметр крышки несколько больше, чем диаметр нижней чашки).

При помощи пипеток проводят пересев жидких культур микроорганизмов. Бродильные трубки используют для определения активности брожения по газообразованию.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические иглы, петли и шпатели (рис. 28).

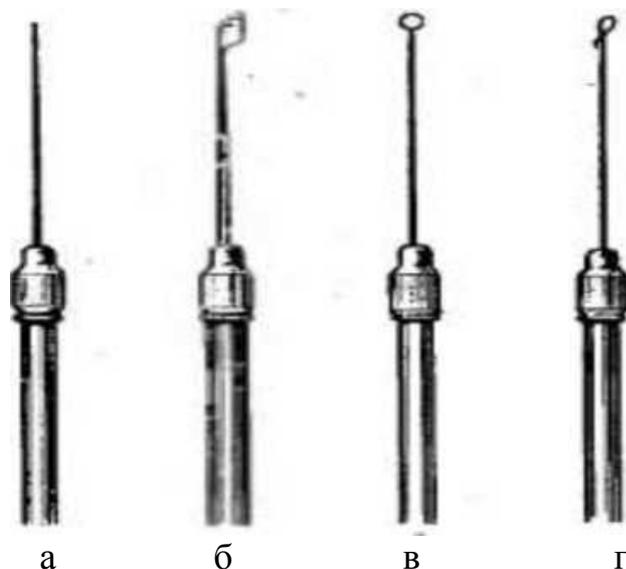


Рисунок 28 – Бактериологическая игла (а); шпатель (б); петли, сделанные правильно (в) и неправильно (г).

Их изготавливают из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, шпателя - 1,5 мм и более. При посевах (и пересевах) культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяются иглы или шпатели.

Шпатели также используют для взятия клеток микроорганизмов из колоний, растущих в субстрат, и для размазывания жидких культур на поверхности плотной питательной среды. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

В связи с частой необходимостью точного дозирования проб и реагентов при проведении лабораторных исследований, механические дозаторы являются неотъемлемой частью лаборатории. Дозаторы переменного объема используются для дозирования жидкостей общим объемом от 0,1 мкл до 10 мл (рис. 29).

Все механические дозаторы работают по принципу воздушного замещения и используются со сменными наконечниками.

При нажатии поршня, в наконечнике возникает отрицательное давление (вакуум), определенный объем жидкости всасывается, вращение дозирующего колесика изменяет высоту поршня, изменяя объем дозирования. Таким образом в наконечник с высокой точностью набирается определенный объем нужного вам вещества.



Рисунок 29 – Дозаторы пипеточные
(<http://www.immertec.org>)

Лабораторные нагревательные плиты предназначены для нагрева и высушивания различных растворов, смесей, проб и образцов (рис. 30).

Модели нагревательных плит различаются размерами платформы, материалом платформы, мощностью, контроллером и т. п.

Достоинства электрических нагревательных плиток для микробиологической лаборатории заключается в том, что нагрев материала происходит равномерно по всей поверхности, достигается высокая максимальная температура, при этом соблюдается высокая точность установки и поддержания температуры, они имеют антикоррозийное покрытие что обеспечивает длительный срок службы.



Рисунок 30 – Плитка нагревательную
(<http://www.kubus-sa.com>)

В микробиологических лабораториях, где требуется применение открытого пламени небольшой тепловой мощности (до 1300 ватт), используется Горелка Бунзена (рис. 31).



Рисунок 31 – Горелка Бунзена
(<https://kolba24.ru>)

Она представляет из себя устройство, имеющее инжектор, установленный в металлической трубке с отверстиями для поступления в трубку атмосферного воздуха, которая закреплена на подставке с боковым вводом для подачи в трубку газа, при этом отверстия выполнены на боковой поверхности трубки, на которой для изменения подачи воздуха в горелку, может быть установлена подвижная заслонка, изменяющая площадь проходного сечения этих отверстий. Является изобретением немецкого химика Роберта Бунзена.

Магнитная мешалка с подогревом (рис. 32) предназначена для перемешивания жидкостей, с помощью вращающегося в магнитном поле якоря.



Рисунок 32 – Магнитная мешалка с подогревом
(<http://texlaborant.ru>)

Широко используется в лабораториях для обучающего процесса и научных исследований, медицинских учреждениях и на производстве для перемешивания образцов.

Для культивирования микроорганизмов в анаэробных и микроаэрофильных условиях применяют микроанаэроустат (рис 33). Создание анаэробной или микрофильной атмосферы для культивирования микроорганизмов в анаэроустате производится с помощью газогенерирующих пакетов типа Анаэрогаз или Кампилогаз.



Рисунок 33 – Анаэроустат EZ-Campy System
(<https://800ezmicro.com>)

Счетчик колоний (рис. 34) предназначен для быстрого и эффективного подсчета количества колоний микроорганизмов на чашках Петри.



Рисунок 34 – Счетчик колоний микроорганизмов ColonyStar производства компании FUNKE GERBER
(<http://ikf.com.ua>)

Использование обычного фломастера значительно упрощает подсчет колоний: с его помощью соответствующая колония помечается, и электронный счетчик колоний автоматически переходит к следующей. В удобный, легко чистящийся пластмассовый корпус счетчика колоний ColonyStar вмонтировано световое поле диаметром около 145 мм. С помощью насадки, уменьшающей световое поле (входит в комплект поставки счетчика колоний), можно производить подсчет колоний на чашках Петри меньшего размера.

Лабораторную посуду (Штангласы или склянки) используют для хранения жидких и сыпучих веществ, обычно лекарств. Они бывают круглые, овальные, прямоугольные. У многих их них притертые пробки. Размеры их невелики – не более литра. Прямоугольные штангласы, составленные в ряд, занимают меньше всего места при хранении (рис. 35).

В ступках дробят вручную твердые вещества. Материал самой ступки должен быть тверже измельчаемого вещества: сталь, чугун, бронза, латунь, стекло, фарфор или агат. Толкут в ступке тяжелым пестом, обычно из того же материала.

В стеклянных банках хранят сыпучие, густые и вязкие вещества. Они легко загружаются и извлекаются из широкого и низкого горла банки. Порошки и мази не так сильно разъедают стенки сосуда, как жидкости. Поэтому требования к стойкости стеклянных банок невысоки, что снижает их стоимость.

Самая распространенная посуда в лаборатории – пробирки. Они есть в любой лаборатории. Ими пользуются биологи и микробиологи, врачи и пищевики, химики. В пробирках смешивают малые объемы веществ, берут пробы. Все пробирки цилиндрической формы. Дно у них бывает разное: плоское, круглое или коническое.

В микробиологии широко используют чашки Петри, которые имеют вид плоского цилиндра с крышкой такой же формы. В чашках Петри, заполненных питательной средой, выращивают колонии микроорганизмов. Изначально чашки Петри были стеклянными, но в наше время все чаще встречаются пластиковые. Применяется также в химии.

Полимерные пробки могут навинчиваться или просто вставляться в горлышко банки. Вставные пробки с отверстием позволяют отмерять жидкость по каплям. Поверх пробки-капельницы навинчивают пробку-колпачок.

Корковые пробки изготавливают из коры коркового дуба. Они легки и не пропускают воздух, однако кислоты и щелочи их разъедают. Корковые пробки бывают бархатные, полубархатные, средние и простые. У бархатных пробок поверхность гладкая, они мягкие и упругие. Полубархатные и средние пробки – пористые и более твердые. Простые пробки покрыты крупными углублениями, они легко ломаются и крошатся. Конические корковые пробки легче откупоривать, чем цилиндрические.



Рисунок 35 – Лабораторная посуда и вспомогательное оборудование: 1 – штангласы; 2 – ступки; 3 – стеклянные банки; 4 – пробирки; 5 – механические весы; 6 – чашка Петри; 7 – полимерные пробки; 8 – корковые пробки; 9 – банки с притертыми стеклянными пробками; 10 – колба Эрленмейера; 11 – мерная колба; 12 – тренога; 13 – резиновые пробки; 14 – мерный стакан.

(<http://www.irtech.ru>)

Жидкости и порошки хранят в банках с притертыми стеклянными пробками. Они выдерживают едкие вещества, разрушающие резиновые и корковые пробки.

Но все же в посуде в притертой стеклянной пробкой нельзя держать щелочь. Просачиваясь в щель между пробкой и горлышком, щелочь намертво приклеивает пробку к банке.

Колба Эрленмейера имеет коническую форму. У нее плоское дно и цилиндрическое горлышко, иногда со шлифом. На боку ее нанесены риски, по которым определяют объем содержимого. Изобрел эту колбу немецкий химик Эмиль Эрленмейер в 1861 г. В конической колбе удобно титровать, например, определять рН жидкости. Также их можно нагревать на горелке Бунзена. В пластиковых колбах Эрленмейера при работе с микроорганизмами микробиологи готовят чистые культуры.

Мерная колба – это грушевидная стеклянная колба с длинной горловиной, иногда со шлифом. Изобрел ее французский технолог Франсуа Декруазиль в 1809 г. Мерная колба имеет одну метку для измерения объема жидкости. У такой колбы широкое плоское основание, на котором она устойчиво стоит без покачивания. В мерных колбах готовят растворы заданной концентрации.

Металлическое кольцо на трех ножках называют треногой. На нее ставят колбы и стаканы, если их надо нагреть на горелке или спиртовке. Может быть покрыта асбестовой сеткой для равномерного нагревания колбы.

Резиновые пробки изготавливают из натурального или бутилового каучука. Они не должны выделять растворимых примесей и запаха. Резиновые устойчивее к кислотам и щелочам, чем корковые. Растворы едких веществ (перманганат калия, формалин, аммиак, перекись водорода) закупоривают пробками из особо стойких видов резины. Однако есть жидкости, способные растворять и резину: бензин, хлороформ, сероуглерод.

Мерный стакан – это цилиндрический стакан из стекла или пластика. Обычно у него есть носик, иногда – ручка и обязательно – мерные деления. С помощью таких стаканов отмеривают жидкости, а также растворяют и подогревают их.

Контрольные вопросы

1. Какое основное оборудование и для каких целей используют в микробиологической лаборатории?
2. Какая аппаратура используется для стерилизации?
3. Расскажите устройство автоклава.
4. Перечислите основные инструменты и посуду, применяемые в микробиологической лаборатории. В чем их назначение?
5. Какие виды световых микроскопов вы знаете, для чего они предназначены?
6. Из каких частей состоит световой микроскоп?
7. Что относят к механической части микроскопа?
8. Каково назначение макро- и микрометрического винтов? Как ими пользоваться?
9. В чем особенности оптической системы микроскопа, из каких частей она состоит?
10. Что такое сухие и иммерсионные объективы?
11. Опишите ход лучей в сухой и иммерсионной системах.

12. Как регулировать степень освещенности препарата?
13. Почему с одной стороны зеркало плоское, а с другой вогнутое? Когда и каким зеркалом пользуются?
14. Какое строение имеет окуляр и в чем его назначение?
15. Опишите устройство конденсора и правила работы с ним.
16. Что означают понятия «увеличительная способность микроскопа» и «разрешающая способность микроскопа» и как их можно определить?
17. Перечислите основные правила работы с биологическим микроскопом.
18. Каков порядок работы при микроскопии препаратов с сухим объективом?
19. Перечислите правила и порядок работы с иммерсионным объективом.
20. Какие методы микроскопии вы знаете, в чем их особенности?
21. На чем основан метод фазово-контрастной микроскопии?
22. Как превратить фазовый (неконтрастный) препарат в контрастный?
23. Из чего состоит фазово-контрастное устройство?
24. Что означают термины «люминесценция», «флюорохромы»?
25. Приведите примеры флюорохромов.
26. Какие виды люминесценции вы знаете?
27. Как готовят препарат для люминесцентной микроскопии?
28. В чем достоинства люминесцентного метода микроскопии?
29. Какое явление лежит в основе метода темнопольной микроскопии? С какой целью используется этот метод?
30. В чем особенности устройства электронного микроскопа и принцип его работы?

Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомиться с бактериологической лабораторией, ее основным оборудованием.
2. Изучить устройство светового микроскопа. Принципы фазово-контрастной, темнопольной, люминесцентной и электронной микроскопии.
3. Освоить приемы работы с иммерсионным объективом микроскопа.
4. Провести микроскопию препаратов с бактериями различной формы.
5. Определить размеры бактериальных клеток.

3. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

3.1 Правила работы и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории

Особенностью бактериологических работ является постоянное соприкосновение сотрудников лаборатории с заразным материалом, культурами патогенных микробов, зараженными животными и выделениями больных. Поэтому все сотрудники бактериологической лаборатории обязаны соблюдать правила работы, которые обеспечивают стерильность и предупреждают возможность возникновения аварий - нештатных ситуаций, при которых создается реальная или потенциальная возможность выделения патогенного агента в воздух производственной зоны, окружающую среду или заражения персонала.

В помещение бактериологической лаборатории нельзя входить без специальной одежды – халата, белой шапочки или косынки, сменной обуви.

Нельзя вносить в лабораторию посторонние вещи.

Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат.

В помещении бактериологической лаборатории категорически запрещается курить, принимать пищу, хранить продукты питания.

Перед началом работы проверяют исправность приборов (газовых и спиртовых горелок). Обо всех неисправностях сообщать ответственному лицу лаборатории, на учебных занятиях – преподавателю.

Весь материал, поступающий в бактериологическую лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный.

При распаковке присланного заразного материала необходимо соблюдать осторожность: банки, содержащие материал для исследования, при получении обтирают снаружи дезинфицирующим раствором и ставят не прямо на стол, а на подносы или в кюветы.

Перенос жидкостей, содержащих патогенные микробы, производят пипеткой с грушей.

О случаях аварии с посудой, содержащей заразный материал, или при пролитии жидкого заразного материала надо немедленно сообщать заведующему лабораторией или его заместителю. Мероприятия по обеззараживанию загрязненных патогенным материалом платья, частей тела, предметов рабочего места осуществляются немедленно.

При исследовании зараженного материала и работе с патогенными культурами микробов необходимо строго соблюдать общепринятые в бактериологической практике технические приемы, исключая возможность соприкосновения рук с заразным материалом.

Зараженный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению, по возможности в тот же день. Инструменты, использо-

ванные в работе с заразным материалом, тотчас после их употребления дезинфицируют, как и поверхность рабочего места.

При выполнении бактериологических работ нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с заразным материалом их дезинфицируют. Рабочее место в конце дня приводят в порядок и тщательно дезинфицируют, а заразный материал и культуры микробов, необходимые для дальнейшей работы, ставят на хранение в запирающийся рефрижератор или сейф.

Работники бактериологических лабораторий подлежат обязательной вакцинации против инфекционных болезней, возбудители которых могут встретиться в исследуемых объектах.

После ознакомления с правилами техники безопасности на кафедре микробиологии студенты расписываются в журнале преподавателя

3.2. Подготовка помещений для работы с микробиологическим материалом

Помещение лаборатории ежедневно до начала работы следует убирать влажным способом. Пыль с поверхностей протирают увлажненной тряпкой, смоченной дезинфицирующим раствором. В качестве дезинфицирующего средства можно использовать 2-3% раствор бикарбоната натрия, 3-5% раствор фенола (карболовой кислоты), лизола или 3% водный раствор хлорамина. Полы моют 3-5% раствором дезинфектанта. Потолки, карнизы, верхнюю часть стен, окрашенные клеевой краской, не реже одного раза в неделю очищают от пыли пылесосом.

Подготовка бокса к работе. Помещение бокса регулярно обрабатывают следующим образом: ежедневно перед началом работы полы протирают дезинфицирующим средством (2%-5% раствором хлорамина); воздух обеззараживают бактерицидными лампами, установленными на высоте 2—2,5 м от поверхности пола, из расчета одна лампа БУВ-30 (1,5—2,5 Вт) на 1 м³ помещения. При указанных условиях бокс облучают 2—3 ч. Перед началом работы лампы выключают. При отсутствии бактерицидных ламп непосредственно перед работой производят дезинфекцию бокса, протирая помещение 5% раствором хлорамина.

Чтобы предотвратить заражение бокса, образцы материалов, подлежащие исследованию, вносят в бокс после предварительного тщательного протирания 3% раствором формалина. По этим же соображениям работа в боксе проводится в стерильных халатах, защитных масках и тапочках, специально предназначенных для бокса.

Воздух в боксе следует регулярно, не менее 2 раз в неделю, проверять на бактериальную обсемененность.

Для проверки чашки с мясо-пептонным агаром и средой Сабуро оставляют открытыми в течение 15 минут. Посев на мясо-пептонном агаре выдерживают в термостате 48 ч при 37°C, чашки со средой Сабуро — 96 ч при 22°C. Допустимым ростом считается не более 5 колоний на чашках.

Количество колоний, превышающее 5 при 15-минутной экспозиции, является показателем высокой обсемененности воздуха бокса. В этих случаях помещение бокса нуждается в дополнительной, более тщательной обработке. Не менее одного раза в неделю помещение бокса моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха.

Рабочее место требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70%-ные (по объему) растворы изопропилового и этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. Поверхность рабочего стола можно дезинфицировать и ультрафиолетовыми лучами. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

3.3. Подготовка лабораторной посуды

Посуда для бактериологических работ должна быть чистой, а для многих исследований — и стерильной, так как использование загрязненной, плохо вымытой посуды может привести к получению неправильных результатов.

Для подготовки лабораторной посуды в микробиологической лаборатории отводится отдельное помещение – моечная. Она должна быть оборудована горячей и холодной водой и всем необходимым инвентарем (тазы, кастрюли, ведра, ерши, щетки и т.д.)

Сильно загрязненную посуду со следами жира обрабатывают в хромовой смеси. Хромовая смесь, будучи сильным окислителем, разрушает органические вещества с образованием растворимых или газообразных продуктов. Перед употреблением хромовую смесь подогревают до температуры 45—50°C, а затем заливают ею грязную посуду. Работать с хромовой смесью необходимо с осторожностью, в фартуке и резиновых перчатках, после тщательно промывать посуду.

Надписи, сделанные на стекле восковым карандашом, легко снимаются щеткой либо кусочком влажной марли с меловым порошком или содой.

Для устранения налета белого цвета, нередко появляющегося на стекле, посуду помещают на 30—40 минут в 5—10% раствор соляной кислоты.

Подготовка новой лабораторной посуды. В ведре с теплой водой растворяют хозяйственное мыло, чтобы образовалось небольшое количество пены, погружают в нее посуду и ставят на слабый огонь. После 15-минутного кипячения посуду вынимают, ополаскивают чистой водой, погружают в теплый 1—2% раствор соляной кислоты, доводят до кипения и вываривают 10—15 минут, чтобы нейтрализовать избыток щелочи, кото-

рый мог остаться при изготовлении стекла. После кипячения в кислоте посуду прополаскивают водопроводной водой и дважды дистиллированной.

При мытье посуды, служащей для постановки серологических реакций, кислоты и щелочи использовать не рекомендуется, так как даже следы этих веществ, оставшиеся на стенках, могут исказить результат реакции. Таковую посуду моют горячей водой, кладут на сетки, чтобы с нее стекла вода, затем несколько раз ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу.

Подготовка лабораторной посуды, бывшей в употреблении. Посуда, в которой содержался зараженный материал, поступает в мойку после предварительной дезинфекции, гарантирующей гибель находящихся в ней патогенных микробов. Перед мытьем из пробирок, чашек и матрасов обеззараженную жидкость выливают в канализацию. Не очень загрязненную посуду моют ершом в горячей воде с мылом, содой или в растворе горчицы. Посуду со следами агара, желатина или другой питательной среды за сутки перед мытьем заливают 2—2,5% раствором едкого натра или едкого калия. Очень загрязненную жирную посуду, не поддающуюся мытью обычным способом, заливают на 30—40 минут хромовой смесью, а затем в течение продолжительного времени промывают сначала проточной водопроводной, затем — дистиллированной водой.

Надежный способ мытья и обеззараживания лабораторной посуды предложен Г.П. Кирсановым (1972). Отработанную лабораторную посуду (пробирки, чашки Петри, предметные стекла с мазками после иммерсионной микроскопии и пр.) стерилизуют в автоклаве в течение 2 ч при 2 атм. Далее посуду загружают в бак и заливают раствором, содержащим на 100 мл дистиллированной воды 5 мл нашатырного спирта и 3 г порошка для стирки хлопчатобумажного и льняного белья. Лабораторная посуда хорошо отмывается и обезжиривается в течение 30 минут кипячения в указанном растворе, затем ее прополаскивают водопроводной водой и дважды дистиллированной. После этого посуду высушивают в сушильном шкафу. Для обработки посуды, применявшейся для выращивания микобактерий туберкулеза на яичных питательных средах, А.В. Ивановым и соавт. (1974) предложен простой способ. Использованные пробирки со средами автоклавируют при 1,5 атм. в течение 30 минут, затем по 250—300 штук укладывают в бачки или эмалированные ведра с плотной крышкой, заливают 1% раствором едкого натра и кипятят 2 ч. Во время кипячения остатки питательной среды растворяются и образуется однородная жидкая мыльно-щелочная смесь, способствующая освобождению пробирок от плотных остатков среды. После 2 ч кипячения мыльно-щелочной раствор сливают для повторного использования (раствор может быть использован 3—4 раза). Прокипяченные отмытые пробирки несколько раз прополаскивают водопроводной водой и высушивают.

Посуду, используемую для приготовления и хранения питательных сред и культивирования микробов, нельзя обрабатывать дезинфицирующе-

щими веществами, так как даже следы их делают питательную среду непригодной для размножения микроорганизмов.

Мытье градуированных пипеток. Пипетки и другая градуированная посуда, поступающая для работы, должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными. На стенках плохо обезжиренной посуды при выливании жидкости остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать той величине, которая указана на шкале деления.

Новые градуированные пипетки, не бывшие в употреблении, моют следующим образом. С помощью резинового баллончика, надетого на пипетку, насыпают в нее горячую мыльную воду и затем погружают в сосуд с такой же водой. Чтобы вода из пипеток не вытекала, уровень жидкости в сосуде должен соответствовать высоте пипеток. Выдержав 20—30 минут в мыльном растворе, пипетки прополаскивают водопроводной водой и переносят в 1—2% раствор соляной кислоты, который постепенно доводят до кипения. Далее пипетки обрабатывают так же, как и остальную стеклянную посуду.

Пипетки, бывшие в употреблении, тщательно протирают тонкой упругой проволокой, на конец которой плотно накручивают кусочек ваты или марли в виде сливы. Для того чтобы загрязнения снимались быстрее и легче, пользуются горячей мыльной водой, раствором пищевой соды или стирального порошка.

Закупорившийся канал пипетки прочищают тонкой проволокой или мандреном от тонких игл шприцев. Промытые пипетки складывают в таз, заливают теплым раствором горчицы или мыльной водой и ставят на слабый огонь. После 20—30-минутного кипячения пипетки вынимают и несколько раз ополаскивают сначала теплой проточной, а затем дистиллированной водой.

Сильно загрязненные пипетки также очищают вначале ершом с мылом или содой, а затем погружают в хромовую смесь, налитую в ванночку или банку, по высоте соответствующую длине обрабатываемых пипеток. В хромовой смеси пипетки выдерживают 20—30 минут, затем в течение нескольких минут промывают проточной и дважды ополаскивают дистиллированной водой.

Мытье предметных и покровных стекол. Предметные и покровные стекла должны иметь абсолютно чистую поверхность и быть хорошо обезжиренными. Капля воды, нанесенная на обезжиренное стекло, растекается равномерно, а на плохо обезжиренном стекле распадается на мелкие капельки. Предметные и покровные стекла рекомендуется мыть и ополаскивать в резиновых перчатках, чтобы не загрязнять их жиром, находящимся на поверхности кожи.

Стекла предметные и покровные, не бывшие в употреблении, моют в теплой мыльной воде и после ополаскивания заливают смесью Никифорова (этиловый спирт и эфир в соотношении 1:1). Если стекла, вынутые через 2—3 дня из смеси Никифорова, сохраняют следы жира, их складывают в

фарфоровую чашечку, заливают 2—5% раствором гидрокарбоната натрия или едкого натра, ставят на слабый огонь и кипятят, считая от момента закипания воды, в течение 20—30 минут. После кипячения в щелочном растворе стекла ополаскивают проточной водопроводной водой, опускают на 10—15 минут в 5—10% раствор соляной кислоты, и затем промывают проточной и дистиллированной водой.

Предметные и покровные стекла, бывшие в употреблении, загрязненные краской и иммерсионным маслом, обрабатывают следующим способом:

- опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем тщательно промывают проточной водопроводной водой;
- заливают 5% раствором гидрокарбоната натрия или щелочи (едкое кали или едкий натр), ставят на слабый огонь и кипятят в течение 30—40 минут.

Сушка и хранение чистой лабораторной посуды. Высушенную посуду просматривают на свет. Стекло ее должно быть совершенно прозрачным, без матового налета и пятен.

Вымытую посуду не вытирают, а сушат при комнатной температуре (холодная сушка) или горячим воздухом в сушильном шкафу при температуре 100—105°C.

Чисто вымытую и высушенную посуду, закрытую пробками с бумажными колпачками или без них, хранят в местах, надежно защищенных от пыли, лучше всего в плотно закрывающемся шкафу.

3.4. Дезинфекция и стерилизация

Дезинфекция. Дезинфекцией является уничтожение микроорганизмов в объектах внешней среды.

В микробиологических лабораториях дезинфекционные мероприятия используются очень широко. Оканчивая работу с заразным материалом, сотрудники бактериологических лабораторий производят профилактическую дезинфекцию рук и рабочего места.

Дезинфекции подвергают отработанный патологический материал (кал, моча, мокрота, различного вида жидкость, кровь) перед выбрасыванием его в канализацию.

Загрязненные патологическим материалом или культурой микробов градуированные и пастеровские пипетки, стеклянные шпатели и металлические инструменты тотчас после их употребления опускают в стеклянные банки с дезинфицирующим раствором, находящиеся на столе у каждого рабочего места.

Обязательной дезинфекции подлежат также использованные в работе предметные и покровные стекла, так как даже в фиксированном и окрашенном мазке иногда сохраняются жизнеспособные микроорганизмы, которые могут явиться источником внутри лабораторного заражения. Не обрабатывается дезинфицирующими средствами только та посуда, в которой

выращивались микроорганизмы. Ее складывают в металлические бачки или биксы, пломбируют и сдают на автоклавирование.

Выбор дезинфицирующего вещества, концентрация его раствора, соотношение между количеством дезинфицирующего вещества и обеззараживаемого материала, а также продолжительность срока дезинфекции устанавливаются в зависимости от конкретных условий, учитывающих в первую очередь устойчивость обеззараживаемых микробов, степень предполагаемого загрязнения, состав и консистенцию материала, в котором они находятся

Стерилизация. Стерилизация, в отличие от дезинфекции, предусматривает уничтожение в стерилизуемом объекте всех вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизацию производят различными способами: паром, сухим горячим воздухом, кипячением, фильтрацией и т. д. Выбор того или иного способа стерилизации определяется качеством и свойствами микрофлоры стерилизуемого объекта.

Подготовка и стерилизация лабораторного оборудования. Перед стерилизацией лабораторную посуду моют и сушат. Пробирки, флаконы, бутылки, матрацы и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробок на каждый сосуд (кроме пробирок) надевают бумажные колпачки.

Резиновые, корковые и стеклянные пробки стерилизуют в отдельном пакете, привязанном к горлышку посуды. Чашки Петри стерилизуют завернутыми в бумагу по 1—10 штук. Пастеровские пипетки по 3—15 шт. заворачивают в оберточную бумагу. В верхнюю часть каждой пипетки вкладывают кусочек ваты, предупреждающий попадание материала в окружающую среду. При заворачивании пипеток нужно соблюдать большую осторожность, чтобы не обломать запаянные концы капилляров. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец.

В верхнюю часть градуированных пипеток, как и в пастеровские пипетки, вставляют предохранительную вату и затем заворачивают в плотную бумагу, нарезанную предварительно полосками шириной 2—2,5 см и длиной 50—70 см. Полоску кладут на стол, левый конец ее загибают и заворачивают им кончик пипетки, затем, вращая пипетку, наворачивают на нее ленту бумаги. Для того чтобы бумага не разворачивалась, противоположный конец ее закручивают или приклеивают. На бумаге надписывают объем завернутой пипетки. При наличии пеналов градуированные пипетки стерилизуют в них.

Лабораторную посуду стерилизуют:

а) сухим жаром при температуре 180°C и 160°C соответственно 1 ч и 150 минут.

б) в автоклаве при давлении 1,5 атм. в течение 60 минут, для уничтожения споровой микрофлоры – 90 минут при 2 атм.

Стерилизация металлических инструментов. Металлические инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты и пр.) стерилизуют в 2% растворе гидрокарбоната натрия, который предупреждает появление ржавчи-

ны и потерю остроты. Лезвия скальпелей и ножниц перед погружением в раствор рекомендуется обертывать ватой.

Стерилизация бактериальных петель. Бактериальные петли, сделанные из платиновой или хромовой проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ стерилизации получил название прокаливания или фламбирования.

Петлю в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную, часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивания сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение, накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокаливание в целом занимает 5—7 с.

Стерилизация патогенных культур микробов. Пробирки и чашки, содержащие культуры микробов, не нужные для дальнейшей работы, складывают в металлический бак, пломбируют крышку и сдают на стерилизацию. Культуры патогенных микробов, вегетативные формы, убивают в автоклаве в течение 30 минут при давлении 1 атм. Сдача баков для стерилизации в автоклавную производятся специально выделенным лицом под расписку. Режим стерилизации регистрируется в специальном журнале. При уничтожении культур микробов I и II групп патогенности, а также материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями, отнесенными к этим группам, баки с отработанным материалом переносят на металлических подносах с высокими бортами в присутствии сопровождающего лица, допущенного к работе с заразным материалом.

Стерилизация кипячением. Стерилизацию кипячением производят в стерилизаторе. В стерилизатор наливают дистиллированную воду, так как водопроводная образует накипь. (Стеклянные предметы погружают в холодную, металлические предметы - в горячую воду с добавлением гидрокарбоната натрия). Стерилизуемые предметы кипятят на слабом огне 30-60 минут. Началом стерилизации считается момент закипания воды в стерилизаторе. По окончании кипячения инструменты берут стерильным пинцетом, который кипятят вместе с остальными предметами.

Стерилизация сухим жаром. Стерилизация сухим жаром производится в печи Пастера. Подготовленный к стерилизации материал кладут на полки так, чтобы он не соприкасался со стенками. Шкаф закрывают и после этого включают обогрев. Продолжительность стерилизации при температуре 150°C 2 ч, при 165°C – 1 ч, при 180°C – 40 мин, при 200°C – 10-15 мин (при 170°C бумага и вата желтеют, а при более высокой температуре обугливаются). Началом стерилизации считается тот момент, когда температура в печи достигнет нужной высоты. По окончании срока стерилизации печь выключают, но дверцы шкафа не открывают до полного охлаждения, так как холодный воздух, поступающий внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде.

Стерилизация паром под давлением. Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве. Автоклав состоит из двух котлов,

вставленных один в другой, кожуха и крышки. Наружный котел называют водопаровой камерой, внутренний — стерилизационной камерой. В водопаровом котле происходит образование пара. Во внутренний котел помещают стерилизуемый материал. В верхней части стерилизационного котла имеются небольшие отверстия, через которые проходит пар из водопаровой камеры. Крышка автоклава герметически привинчивается к кожуху. Кроме перечисленных основных частей, автоклав имеет ряд деталей, регулирующих его работу: манометр, водомерное стекло, предохранительный клапан, выпускной, воздушный и конденсационный краны. Манометр служит для определения давления, создающегося в стерилизационной камере. Нормальное атмосферное давление (760 мм рт. ст.) принимается за нуль, поэтому в неработающем автоклаве стрелка манометра стоит на нуле. Между показаниями манометра и температурой имеется определенная зависимость, отраженная в таблице.

Таблица 1 – Соотношения показаний манометра и температуры кипения воды

Показания манометра, атм.	Темп. кипения воды, °С	Показания манометра, атм.	Темп. кипения воды, °С
0,0	100	0,8	117
0,2	105	0,9	119
0,4	110	1,0	121
0,5	112	1,5	127
0,6	114	2,0	134
0,7	116	—	—

Красная черта на шкале манометра определяет максимальное рабочее давление, которое допускается в автоклаве. Предохранительный клапан служит для предохранения от чрезмерного повышения давления. Его устанавливают на заданное давление, то есть, давление, при котором нужно производить стерилизацию, при переходе стрелки манометра за черту клапан автоклава автоматически открывается и выпускает лишний пар, замедляя тем самым дальнейший подъем давления.

На боковой стенке автоклава имеется водомерное стекло, показывающее уровень воды в водопаровом котле. На трубке водомерного стекла нанесены две горизонтальные черты — нижняя и верхняя, обозначающие соответственно допускаемый нижний и верхний уровень воды в водопаровой камере. Воздушный кран предназначен для удаления воздуха из стерилизационной и водопаровой камер в начале стерилизации, так как воздух, являясь плохим проводником тепла, нарушает режим стерилизации. На дне автоклава находится конденсационный кран для освобождения стерилизационной камеры от конденсата, образующегося в период нагревания стерилизуемого материала.

3.5. Правила работы с автоклавом

Правила работы с автоклавом. Перед началом работы осматривают автоклав и контрольно-измерительную аппаратуру. В автоклавах с автоматическим регулированием пара на электровакуумном манометре водопаровой камеры стрелки устанавливают в соответствии с режимом стерилизации: нижнюю стрелку ставят на 0,1 атм. ниже, верхнюю—на 0,1 атм. выше рабочего давления, водопаровую камеру заполняют водой до верхней отметки мерного стекла. В период заполнения водой вентиль на трубе, по которой пар поступает в камеру, держат открытым для свободного выхода воздуха из котла. Стерилизационную камеру автоклава загружают стерилизуемым материалом. После этого крышку (или дверцу) автоклава закрывают, плотно закрепляя центральным затвором или болтами; чтобы избежать перекоса, болты завинчивают крест-накрест (по диаметру). Затем включают источник подогрева (электрический ток, пар), закрывая вентиль на трубе, соединяющей источник пара со стерилизационной камерой. С началом парообразования и создания давления в водопаровой камере производят продувку (удаление воздуха из стерилизационного котла). Способ удаления воздуха определяется конструкцией автоклава. Вначале воздух выходит отдельными порциями, затем появляется ровная непрерывная струя пара, указывающая, что из стерилизационной камеры воздух полностью вытеснен. После удаления воздуха кран закрывают, и в стерилизационной камере начинается постепенное повышение давления.

Началом стерилизации считается тот момент, когда стрелка манометра показывает заданное давление. После этого интенсивность подогрева уменьшают, чтобы давление в автоклаве в течение нужного времени оставалось на одном уровне. По окончании времени стерилизации подогревание прекращают. Закрывают вентиль в трубопроводе, подающем пар в стерилизационную камеру, и открывают вентиль на конденсационной (нисходящей) трубе для снижения давления пара в камере. После падения стрелки манометра до нуля медленно ослабляют прижимные приспособления и открывают крышку автоклава.

Температура и продолжительность стерилизации определяются качеством стерилизуемого материала и свойствами тех микроорганизмов, которыми он заражен.

Контроль температуры в стерилизационной камере осуществляется периодически с помощью бактериологических тестов. Биотесты изготавливаются бактериологическими лабораториями ЦСЭН. В случае непрохождения данных тестов производят проверку технического состояния автоклава.

Контрольные вопросы

1. Какие правила необходимо соблюдать при работе в микробиологической лаборатории?
2. Как устроена микробиологическая лаборатория?

3. Как производится обработка помещений микробиологической лаборатории?
4. Расскажите о подготовке бокса к работе.
5. Чем отличается мытье новой лабораторной посуды от лабораторной посуды, бывшей в употреблении?
6. Особенности мытья градуированных пипеток.
7. Как правильно мыть предметные и покровные стекла?
8. Расскажите о сушке и хранении чистой лабораторной посуды.
9. Что такое дезинфекция и стерилизация?
10. Перечислите основные дезинфицирующие средства и растворы.
11. Виды стерилизации.
12. Правила работы с автоклавом.

Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомиться с работой автоклава, печи Пастера, аппарата Коха.
2. Подготовить стеклянную посуду (чашки Петри, колбы, и т.д.) и питательные среды к стерилизации.
3. Подготовить помещение бокса для посевов.

ГЛЮОССАРИЙ

Автоклав – аппарат для проведения процессов стерилизации при нагреве и под давлением выше атмосферного.

Антисептика – (лат. *anti* – против, *septicus* – гниение) – система мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, патологическом очаге, органах и тканях, а также в организме больного в целом, использующая механические и физические методы воздействия, активные химические вещества и биологические факторы.

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов в исследуемый объект.

Глубинный посев – один из стационарных методов культивирования микроорганизмов, при котором суспензию микроорганизмов вносят в расплавленные плотные питательные среды либо в жидкие питательные среды.

Дезинфекция – уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Иммерсия в микроскопии – это введение между объективом микроскопа и рассматриваемым в нем предметом жидкости для усиления яркости и расширения пределов увеличения изображения.

Инкубация – культивирование при определенной температуре.

Ирисовая диафрагма – система серповидных пластин, позволяющих изменять количество проходящего через объектив света, что определяет соотношение яркости оптического изображения объекта к яркости самого объекта, а также устанавливать необходимую глубину резкости.

Колония – это видимое изолированное скопление представителей одного вида микроорганизмов, образующееся при размножении одной колониеобразующей единицы (КОЕ) на плотной питательной среде (на поверхности или в глубине её). Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим культуральным признакам.

Конденсор – (от лат. *condense* – сгущаю, уплотняю), короткофокусная линза или система линз, используемая в оптическом приборе для освещения, рассматриваемого или проецируемого предмета. Конденсор собирает и направляет на предмет лучи от источника света, в том числе и такие, которые в его отсутствие проходят мимо предмета; в результате такого «сгущения» светового потока резко возрастает освещённость предмета.

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

Микробиология – наука о живых организмах, невидимых невооруженным глазом (микроорганизмах): бактериях, археобактериях, микроскопических грибов и водорослей, часто этот список продляют простейшими и вирусами.

Микроскоп – прибор, предназначенный для получения увеличенных изображений, а также измерения объектов или деталей структуры, невидимых невооружённым глазом. Представляет собой совокупность линз.

Накопительная культура – культура, в которой преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

Объектив – оптическое устройство, проецирующее изображение на плоскость.

Окуляр – обращенная к глазу часть микроскопа, предназначенная для рассматривания с некоторым увеличением оптического изображения, даваемого объективом микроскопа.

Пастеризация – нагревание материала при температуре ниже 100 °С. Используется для обеспложивания питательных сред, содержащих компоненты, разлагающиеся при высоких температурах.

Поверхностный посев – осуществляется путем нанесения суспензии микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды. Используется для культивирования аэробных культур.

Посев – внесение клеток микроорганизмов (посевого материала – инокулята) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры.

Разрешающая способность – это способность микроскопа выдавать чёткое раздельное изображение двух близко расположенных точек объекта.

Стерилизация – полное освобождение какого-либо предмета от всех видов микроорганизмов, включая бактерии и их споры, грибы, вирионы, а также от прионного белка, находящихся на поверхностях, оборудовании, в пищевых продуктах и лекарствах. Осуществляется термическим, химическим, радиационным, фильтрационным методами.

Фламбирование – метод стерилизации мелких металлических инструментов путем прокаливания в пламени горелки непосредственно перед использованием.

Чистая культура – популяция микроорганизмов, представляющая собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизмов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алешукина, А. В. Медицинская микробиология: учебное пособие для вузов / А. В. Алешукина. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2011. – 437 с.
2. Богданова О. Ю. Систематика и классификация микроорганизмов: метод. указания к практическим работам по дисциплине «Микробиология» / О. Ю. Богданова. – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2012. – 80 с.
3. Василькин В. М. Методические указания к лабораторным занятиям по технологии хранения и переработки растениеводческой продукции / В. М. Василькин, В. И. Каргин, Д. А. Костин, И. П. Бектяшкин. Саранск: 2006. – 38 с.
4. Василькин В. М. Методические указания по выполнению курсового проекта по технологии хранения, переработки и стандартизации продукции растениеводства / В. М. Василькин, В. И. Каргин, А. А. Моисеев. Саранск: 2007. – 69 с.
5. Василькин В. М. Учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям по курсу: «Технохимический контроль сельскохозяйственного сырья и продуктов переработки» / В. М. Василькин, И. П. Бектяшкин. Саранск, 2007. – 83 с., ил.
6. Василькин В. М. Учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям по курсу: «Технологии хранения, переработки и стандартизация сельскохозяйственной продукции» / Часть 1 / В. М. Василькин, В. И. Каргин, В. Е. Камалихин, А. А. Моисеев. Саранск: 2011. – 163 с.
7. Василькин В. М. Методические указания по самостоятельной работе по дисциплине «ТХПРП». Часть I. / В. М. Василькин, В. И. Каргин, В. Е. Камалихин. Саранск: Референт, 2013. – 26 с.
8. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. А. Радчук, Г. В. Дунаев, Н. М. Колычев и др.; под ред. Н. А. Радчука. – М. : Агропромиздат, 1991. – 383 с.
9. Градова Н. Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова и др. – М. : ДеЛи принт, 2001. – 131 с.
10. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – 6-е изд., испр. – М. : Дрофа, 2013. – 444 с.
11. Замотаева Н. А. методические указания по выполнению лабораторных и практических работ по микробиологии / Н. А. Замотаева. – Саранск, Полиграф, 2015. – 41 с.
12. Каменская Е. П. Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Методы микроскопии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: – <http://irbis.bti.secna.ru/doc5/201509.pdf>.
13. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М. : Медицина, 1978. – 394 с.

14. Лаптев С. В. Микробиология: учебное пособие / С. В. Лаптев, Н. И. Мезенцева, Е. П. Каменская и др.; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск : Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – 319 с.
15. Мудрецова-Висс К. А. Микробиология, санитария и гигиена: учебник / К. А. Мудрецова-Висс, В. П. Дедюхина. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: ИД «ФОРУМ»: ИНФРА-М, 2009. – 400 с.
16. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др. – М. : Академия, 2005. – 608 с.
17. Никитина Е. В. Микробиология: учебник / Е. В. Никитина, С. Н. Киямова, О. А. Решетник. – СПб. : ГИОРД, 2008. – 368 с.
18. Павлович С. А. Микробиология с микробиологическими исследованиями: учебное пособие / С. А. Павлович. – Минск: Вышшая школа, 2009. – 502 с.
19. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко, В. Б. Родионова, Д. И. Скородумов. – М.: Колос, 2001. – 344 с.
20. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук // Под ред. А. И. Нетрусова. – М. : ИЦ «Академия», 2010. – 608 с.
21. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М. : Дрофа, 2004. – 256 с.
22. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М. : Мир, 1987. – 567 с.

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Методические указания по курсам «Общая биология и микробиология», «Основы микробиологии», «Микробиология», «Пищевая микробиология» для студентов всех форм обучения направлений подготовки 19.03.01, 19.03.02, 38.03.07

Редактор Василькин В. М.

Технический редактор Василькин Н. В.

Подписано в печать 09.10.17. Формат 60*84 1/16. Усл. п. л. 2,32. Тираж 100 экз. Заказ 2017-10.

Печать – ризография, множительно-копировальный аппарат «RISO EZ300».

Издательство Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарева. 656038, г. **Оригинал-макет подготовлен МГУ им. Н. П. Огарева.**

