

Лабораторне заняття № 1

Тема: Організація досліджень в лабораторії промислової біотехнології

Мета: ознайомитись з принципами організації та особливостями роботи в лабораторії промислової біотехнології, технікою безпеки при роботі на лабораторних заняттях. Ознайомитись з методами стерилізації приміщень і живильних середовищ.

ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ.

Лабораторія промислової біотехнології повинна бути ізольована від інших підрозділів і включати такі приміщення:

1. Кімнату для миття посуду, оснащену раковинами із кислотостійкого матеріалу, дистильатором, стелажми для сушіння посуду.

2. Кімнату для приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів, забезпечену технічними, аналітичними вагами, рНметром, бідистильатором, холодильними камерами, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, складовими живильних середовищ.

3. Приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду, оснащене горизонтальними чи вертикальними автоклавами класу "В"(наприклад, АВ – 75), сушильною шафою з режимом роботи 160-180°C (наприклад, ШСС – 80).

4. Стерильне асептичне приміщення (бокси, операційні кімнати) для ізолювання, отримання чистих, накопичувальних культур, для культивування штамів-продуцентів, забезпечену ламінар-боксами (камерами, у яких повітря проходить через бактерицидні фільтри). Стерилізують бокс за допомогою бактерицидних ламп типу ОБП – 300, БУФ – 15, БУФ – 30 або альтернативних іноземних марок.

5. Кімнату для зберігання чистих культур мікроорганізмів-продуцентів, оснащену термостатами та холодильними камерами з регульованими умовами.

6. Лабораторну кімнату з термостатом (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростатом (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), фотоелектроколориметром, водяною банею, люміностантною камерою для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, електричними шейкерами (пристрої для культивування мікроорганізмів при постійному струшуванні («качалки»); центрифугами, мікроскопами з освітлювачами.

7. Робочі місця повинні бути обладнані газовими пальниками, штативами для бактеріальних петель та пробірок, дезінфікуючим розчином.

ПРАВИЛА РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Співробітники мікробіологічних лабораторій та студенти на лабораторних заняттях повинні пам'ятати, що вони працюють із культурами мікроорганізмів, які не завжди є нешкідливими для здоров'я людини. Тому, при роботі в лабораторії промислової лабораторії необхідно завжди дотримуватись правил безпеки:

1. До приміщення лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу - халату.

2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.

3. Робоче місце мікробіолога повинно бути добре освітленим та зручним.

4. Працювати у лабораторії дозволяються лише у спецодязі (халаті) з прибраним волоссям.

5. Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.

6. Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.
7. У приміщенні лабораторії не дозволяється приймати їжу, не допускається зайвих розмов і непотрібних переходів. Працювати бажано сидячи.
8. При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезінфікуючим розчином.
9. У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витіканням слід негайно повідомити відповідальну особу і провести заходи для обеззараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.
10. При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.
11. Користуватися лише своїм робочим місцем і прикріпленим до нього обладнанням.
12. Всі посіви мають бути підписані.
13. Під час роботи підтримувати чистоту та порядок. Уникати зайвих рухів руками над відкритими чашками Петрі. Всі реактиви та барвники ставити на свої місця, не класти на столи пробки від пробірок, піпетки, бактеріологічні петлі.
14. Використані піпетки, предметні й покривні скельця, шпатель і т.д. поміщають у дезінфікуючий розчин. Пінцети, бактеріологічні петлі фламбують у полум'ї пальника і ставлять у штатив.
15. Усі використані матеріали (відпрацьовані пробірки з культурами мікроорганізмів, інфіковані матеріали) знешкоджують в автоклаві. Ця робота виконується співробітниками лабораторії.
16. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.
17. Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук - по закінченні роботи руки дезінфікуються.
18. Після закінчення роботи поставити в термостат засіяні чашки й пробірки. Культури мікроорганізмів і залишки досліджуваного матеріалу необхідно здати викладачеві, а робоче місце привести в порядок і продезінфікувати.
19. Необхідно проводити вологе прибирання і періодичну дезінфекцію всіх робочих приміщень.

Питання для актуалізації знань

1. Дайте класифікацію зовнішніх чинників, що впливають на життєдіяльність мікроорганізмів.
2. Які чинники фізичної природи, Ви знаєте?
3. Який вплив на мікроорганізми має сонячне світло, УФ промені?
4. Який вплив на мікроорганізми мають хімічні речовини?
5. Які методи боротьби з патогенними мікроорганізмами Ви знаєте?

Теоретичні відомості

Для мікроорганізмів характерна надзвичайно велика здатність пристосовуватися навіть до таких умов, за яких життя макроорганізму неможливе.

Фактори навколишнього середовища, що впливають на життєздатність мікробів, можна розділити на три групи: фізичні, хімічні і біологічні.

Фізичні фактори. Найбільший вплив на розвиток мікроорганізмів мають температура, висушування, променева енергія, ультразвук, осмотичний тиск, реакція середовища.

Температура. Усі мікроорганізми мають високу чутливість до температурного чинника. Так, низькі температури пригнічують гнилісні і бродильні процеси, а чергування високих і низьких температур призводить до загибелі мікроорганізмів. Більшість аспорогенних бактерій гине за температури 58-60°C через 30-60 хвилин. Спори бацил і клостридій більш стійкі, ніж вегетативні клітини, вони можуть витримати кип'ятіння від декількох хвилин до 3-х годин.

Залежно від температурних параметрів, у межах яких мікроорганізми розмножуються або лише зберігаються, всі мікроби ділять на три групи: *психрофіли*, *мезофіли*, *термофіли*.

Психрофіли – холодолюбні мікроби, оптимальна температура росту для них лежить у межах +10–15°C, максимальна +25–30 °C, мінімальна – 0–5 °C.

Мезофіли – найбільш поширена група мікробів, до якої належать більшість патогенних мікроорганізмів і сапрофіти. Оптимальна температура для них +28–37 °C, мінімальна –10–20 °C, максимальна – +43–45 °C.

Термофіли – теплолюбні мікроорганізми, оптимальна температура для них – +50–60 °C і більше, максимальна – +75 °C, мінімальна – +45 °C. Вони населяють води гарячих мінеральних джерел, кишечник людини і тварин, ґрунт, спричиняють перепрівання сіна, зерна, торфу.

У основі бактерицидної дії високих температур лежать ушкодження рибосом, цитоплазматичної мембрани, порушення осмотичного бар'єру, денатурація білків.

Зниження температури нижче оптимальної не так згубно впливає на прокаріотів, як її підвищення понад максимальну. На явищі впливу високих температур ґрунтуються поширені способи знезараження продовольчих продуктів, поживних середовищ, посуду та інструментів. Вони дістали назву **пастеризації** і **стерилізації**.

Пастеризація – це нагрівання продукту до 90-100°C, тривалість процесу залежить від температури і звичайно складає 20-40 хв. При пастеризації гинуть не всі мікроорганізми. Деякі термостійкі бактерії, а також спори багатьох бактерій залишаються живими. У зв'язку з цим пастеризовані продукти варто охолоджувати до температури не вище 10°C і зберігати на холоді, щоб затримати проростання спор і розвиток збережених клітин. Пастеризують молоко, пиво, ікру, фруктові соки і деякі інші продукти.

Стерилізація – це нагрівання при температурах вище 100°C протягом певного часу, при якому відбувається загибель вегетативних клітин мікроорганізмів і їхніх спор. Стерилізації піддають різні банкові консерви, багато предметів і матеріалів, які використовуються в медичній і мікробіологічній практиці.

Низькі температури мікроби витримують порівняно легко. Наприклад, деякі види бактерій не втрачають життєздатності навіть при температурі рідкого водню (-253 °C). При дії низьких температур прокаріоти можуть впадати в анабіотичний стан, зберігаючи тривалий час свою життєдіяльність. Низькі температури широко використовуються для зберігання різних продуктів, які швидко псуються.

Використовують два способи зберігання продуктів на холоді:

- 1) в охолодженому стані при температурі від 10 °C до -2 °C;
- 2) у замороженому стані при температурі від -12 до -30 °C.

Висушування призводить до зневоднення мікробної клітини, порушення проникності поживних речовин, внаслідок чого клітина гине. Найменша кількість води, при якій ще можливий розвиток прокаріотів, становить 20-30 % загальної маси організму. Менш вимогливі до умов зволоження цвілеві гриби. Вони можуть розвиватися навіть тоді, коли вміст вологи в субстраті дорівнює 10-15 %.

За мінімальною потребою у волозі розрізняють:

гідрофіти – мікроорганізми, що розвиваються при відносній вологості середовища 96-98% (до них відноситься більшість бактерій);

мезофіти – мікроорганізми, які живуть при вологості середовища 92-94% (це більшість грибів і дріжджів);

ксерофіти – мікроорганізми, що потребують не більше 90 % вологості (до них відносять деякі гриби).

Під впливом висушування швидко гинуть гонококи, менінгококи, трепонеми. Деякі патогенні мікроби тривалий час зберігаються у висушеному стані (спори сибірки – упродовж 10 років, стафілококи, мікобактерії туберкульозу – 90 діб, коринебактерії дифтерії – 1 тиждень і більше, холерні вібріони – 2 доби).

Висушування у вакуумі за низьких температур не вбиває бактерії і віруси. Цей метод висушування називають **ліофільним** (ліофілізація), його використовують у виробництві живих вакцин проти туберкульозу, чуми, туляремії тощо, вбитих вакцин, сироваток та інших медичних препаратів.

Променева енергія. Різні види випромінювання (ультрафіолетове, рентгенівське, радіаційне) мають бактерицидну дію. Одні бактерії переносять дію світла легко (пурпурні), на інших сонячне світло впливає негативно. Найбільшу бактерицидну дію виявляють прямі промені сонця.

Різні види випромінювання можуть викликати як бактерицидний, так і бактериостатичний ефект. До такого випромінювання належить ультрафіолетове випромінювання (довжина хвилі 200-300 нм), яке використовують з метою стерилізації, для чого застосовують бактерицидні лампи. Ультрафіолетове випромінювання зумовлює утворення пероксидних сполук, які руйнують молекули ДНК. Це призводить до загибелі мікробів, ому його використовують для стерилізації повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах, операційних, а також для знезараження деяких предметів і інфікованого матеріалу. Час опромінення 20 хв.

Ультразвук призводить до руйнування цитоплазматичних структур, тому діє на мікроби бактерицидно. Це використовують для знезараження предметів, а також під час виготовлення вакцин, для стерилізації харчових продуктів.

Реакція середовища. Більшість патогенних мікроорганізмів ростуть при слаболужній реакції середовища (рН 7,2-7,4), нейтральній або слабокислій, більшість грибів – при рН 5-6. Згубна дія рН пов'язана з денатурацією ферментів, порушенням осмотичного бар'єру клітинної мембрани.

Високий і низький осмотичний тиск зумовлює розрив цитоплазматичної мембрани клітини (осмотичний шок), тому мікроби швидко гинуть як у гіпотонічному, так і в гіпертонічному розчинах.

Хімічні фактори. Хімічні речовини по-різному діють на мікроорганізми. Одні з них мікроби використовують як джерело енергії і пластичного матеріалу, до інших вони байдужі, а деякі хімічні речовини згубні для них.

У залежності від фізико-хімічного складу середовища, концентрації, часу дії, температури хімічні сполуки діють на мікроби по-різному. У малих дозах вони діють як подразники, а у великих дозах пошкоджують клітинну стінку, а потім і білки. Барвники здатні затримувати ріст клітин. Солі важких металів (свинець, срібло, ртуть) викликають коагуляцію білків.

За характером дії хімічні сполуки поділяють на декілька груп:

- 1) Галогенові препарати (хлор, дезактин, хлорне вапно, хлорамін Б, йод і його похідні) – окиснюють активні групи молекул білків, зумовлюють їх денатурацію.
- 2) Окисники (озон, пероксид водню, перманганат калію) – окиснюють активні групи молекул білків, ушкоджують цитоплазматичну мембрану і клітинну стінку.
- 3) ПАР – детергенти (жирні кислоти, мило, синтетичні мийні засоби, що ушкоджують клітинну стінку і цитоплазматичну мембрану.
- 4) Фенол, крезол, нітрохлорбензол і їх похідні – ушкоджують клітинну стінку і зумовлюють денатурацію білка.
- 5) Акрідини (дибензопіридин) *E. coli* – володіють спорідненістю до нуклеїнових

кислот і порушують процеси клітинного поділу.

6) Альдегіди (формальдегід – 40 % розчин формаліну, уротропін, глутаровий альдегід, гліоксаль) зумовлюють денатурацію білків.

7) Кислоти (оксолінова, борна, бензойна, саліцилова), луги (аміак і його солі, гідроксид калію і натрію) зневоднюють клітину, зумовлюють коагуляцію і розщеплення білків.

8) Солі важких металів – призводять до коагуляції білків, а тому зумовлюють загибель мікроорганізмів і вірусів (найбільш діючі – Hg, Cr, Pb, Zn).

9) Барвники (метиленовий синій, брильянтовий зелений, риванол, акрифлавін) діють бактеріостатично і бактерицидно.

Під **хімічною стерилізацією**, або **дезінфекцією** розуміють знезараження матеріалів, предметів за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують розчин карболової кислоти (3-5 %), лізолу (1-2 %), формаліну (4 %), хлораміну (1-5 %), хлорного вапна (10-20%).

Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як консерванти при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин тощо. Розчини токсичних речовин застосовують як дезінфікуючі речовини в харчовій промисловості, у сільському господарстві для протравлення насіння та ґрунту.

ІНСТРУКЦІЯ

Завдання 1. Ознайомитись з впливом зовнішніх чинників на мікроорганізми.

Використовуючи матеріали лекції, підручника і методичних вказівок, заповніть таблицю 1.

Таблиця 1

Вплив зовнішніх чинників на мікроорганізми

Зовнішні чинники	Експозиція/концентрація речовин	Біологічна дія
Чинники фізичної природи		
1.		
2.		
3.		
...		
Чинники хімічної природи		
1.		
2.		
3.		
...		

Завдання 2. Назвіть методи стерилізації. Заповніть таблицю 2.

Таблиця 2

Методи стерилізації	Коротка характеристика	Область застосування

? питання для самоконтролю

1. Що таке бактерицидна і фунгіцидна дія?
2. Що таке бактериостатичний ефект?
3. Який вплив на мікроорганізми мають УФ промені?
4. Який вплив має температура на бактеріальні клітини?
5. Назвіть методи стерилізації, які використовують у мікробіології.