



ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
УПРАВЛЕНИЕ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ И ПОВЫШЕНИЯ
КВАЛИФИКАЦИИ

Кафедра «Производственная безопасность»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ к выполнению лабораторной работы

«Правила работы с культурами микроорганизмов при исследовании кишечной флоры»

Составитель
Киреева В.В.

Ростов-на-Дону, 2013



Аннотация

Методические указания разработаны в соответствии с учебными программами дисциплин «Физиология человека», «Биология с основами экологии», «Биотехнология» для бакалавров 1, 3 курсов направлений 280700, 110800, 080507 всех форм обучения.

Содержат изложение правил работы с культурами микроорганизмов при проведении бактериологических исследований.

Составитель



Киреева В.В., д. биол. н., профессор





Оглавление

1. Цель работы.....	4
2. Общие сведения	4
3. Приборы и оборудование	5
4.Правила работы в микробиологической учебной лаборатории	7
5. Задание	9
6.Порядок выполнения работы.....	9
7.Составление протокола лабораторной работы	12
8. Подготовить ответы на контрольные вопросы.....	12
9.Литература.....	13



1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение и освоение приемов работы с чистыми культурами микроорганизмов.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Изучать различные свойства микроорганизмов можно только в условиях, когда они могут расти, размножаться и проявлять свои жизненные функции. Это достигается при выращивании микроорганизмов, прежде всего, в стерильных условиях.

В лабораторных условиях микроорганизмы обычно выращивают в жидких и на плотных питательных средах, помещенных в пробирки, колбы или чашках Петри. Чистые культуры хранят преимущественно в пробирках.

Для предохранения содержимого от попадания посторонних микроорганизмов из окружающего воздуха пробирки с культурами закрываются ватно-марлевыми пробками. Культуры, выращенные изолированно от посторонних микроорганизмов, называются чистыми. Во избежание попадания посторонних микроорганизмов в пробирки с чистой культурой необходимо соблюдать специальные правила.

Если материал культуры находится на плотной среде, то его берут стерильной бактериологической петлей, если в жидкой среде, то он берется пипеткой. В этом случае используются заранее простерилизованные пипетки, хранящиеся в бумажных пакетах или металлических футлярах. Вата, вложенная в открытый



конец пипетки, предохраняет от попадания в нее посторонних микроорганизмов.

3. ПРИБОРЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование в учебной лаборатории такое же, как и в любой микробиологической лаборатории.

1. Термостат – прибор с двойными стенками, между которыми находится воздух или вода. С помощью терморегулятора в термостате поддерживается постоянная температура. Контролируют температуру термометром, установленным в верхней стенке термостата. Мезофилы выращиваются в термостате при температурах от 25° С (для большинства почвенных микроорганизмов) до 37°С (для микроорганизмов кожных покровов, кишечника человека и животных). Термофилы выращиваются на жидких средах при температурах от 45°С до 60°С.

2. Сушильный шкаф для стерилизации стеклянной посуды, ваты, марли и т.д. В нем стерилизуют сухим жаром при 160...170°С 1,5 ч. Показателем достаточной стерилизации является легкое пожелтение бумаги, в которую завернуты стерилизуемые предметы.

3. Бактерицидная лампа (БУВ - 15, БУВ- 30) для стерилизации воздуха в помещении лаборатории после работы с микроорганизмами.

4. Холодильник для хранения музейных культур микроорганизмов и ряда питательных сред.

5. Боксовая комната или бокс для пересева культур. Бокс



Правила работы с культурами микроорганизмов при исследовании кишечной флоры

– это небольшое замкнутое пространство, где нет движения воздуха и стерилизация воздуха осуществляется бактерицидной лампой. Бокс хорошо обеспечивает условия стерильности, необходимые для посева чистых культур, так как исследователь через специальное отверстие бокса (рукав) просовывает в него только руки и осуществляет все посеvy, проводя манипуляции над зажженной в боксе спиртовкой.

6. Шкафы для посуды и сред.

7. Лабораторные столы, покрытые пластиком для удобства дезинфекции.

Оборудование рабочего стола

1. Спиртовки для фиксации препаратов, фламбирования (обжигания) бактериологической петли, пинцета, обжигания краев пробирок и поверхности ватно-марлевых пробок.

2. Предметные стекла с луночками и без них, покровные стекла.

3. Восковой карандаш для надписей по стеклу.

4. Пробирки с культурами и пустые штативы для пробирок.

5. Чашки Петри – плоские чашки из тугоплавкого стекла, в которые наливаются питательные среды для выращивания микроорганизмов.

6. Пипетки, бактериологические петли, ватно-марлевые пробки.



4. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ УЧЕБНОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Не входить в лабораторию в пальто, не вносить посторонних предметов.

2. Работать в лаборатории в наглухо застегнутом халате и головном уборе (косынка, шапочка, колпачок) и только на одном постоянном закрепленном за студентом месте с микроскопом и материалами.

3. На рабочем месте не должно быть ничего лишнего, кроме оборудования, которое на нем установлено, и всего необходимого для выполнения задания.

4. Соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя. Не допускать излишних разговоров и хождений. Соблюдать правила обращения со спиртовкой, электроприборами, химическими реактивами.

5. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и т.п. поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором (1%-й раствор хлорамина, 3%-й раствор фенола). Пинцеты, иглы, бактериологические петли и другие металлические предметы обжечь в пламени спиртовки и поставить на место.

6. Чашки Петри и пробирки с питательной средой, засеянной культурами микроорганизмов, поставить в термостат, написать на них восковым карандашом фамилию студента, номер группы и дату посева.

7. Стол, одежду, обувь и другие предметы при случай-



Правила работы с культурами микроорганизмов при исследовании кишечной флоры

ном попадании культуры микроорганизмов (разбилась пробирка, чашка, упала петля, капля с культурой) подвергнуть немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя 3%-м раствором фенола с помощью ваты и пинцета. Вату после обработки опустить в сосуд с дезраствором, который находится на лабораторном столе, пинцет прокалить над пламенем спиртовки.

8. После окончания работы бактериальные культуры и остатки исследуемого материала сдать преподавателю. Выносить из лаборатории мазки с культурами или культуры в пробирках, чашках категорически запрещается. Навести порядок на рабочем столе, показать преподавателю тетрадь с записями и зарисовками. Убрать халат и шапочку в полиэтиленовый мешок.

9. Сдать стол дежурному студенту, тщательно вымыть руки с мылом. Дежурный студент сдает аудиторию дежурному лаборанту.

10. Все студенты, ознакомившись с правилами работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории, расписываются в специальном журнале по технике безопасности.

11. Категорически запрещается принимать пищу, хранить продукты питания. Рекомендуется меньше разговаривать и без необходимости двигаться.

12. Помещение лаборатории убирать влажным способом ежедневно до начала занятий, стирать пыль со столов и мыть пол. По окончании занятий помещение обработать бактерицидной лампой в течение часа.

13. Пересев культур микроорганизмов производить в боксе, который должен быть чисто вымыт горячей водой с мылом и облучен бактерицидной лампой.



Правила работы с культурами микроорганизмов при исследовании кишечной флоры

14. Рабочие халаты кипятить, затем стирать и гладить в помещении лабораторий.

15. Уходя, выключить все электроприборы, кроме термостата и холодильников.

5. ЗАДАНИЕ

Освоить правила работы при пересеве чистых культур микроорганизмов, предупреждающие их загрязнение посторонней микрофлорой.

6. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

6.1. Зажечь спиртовку или газовую горелку.

6.2. Взять в левую руку пробирку с культурой отверстием вверх (пробирка должна находиться в наклонном положении между большим и указательным пальцами).

6.3. Взять правой рукой бактериологическую петлю за держатель, как карандаш, и прокалить в пламени спиртовки сначала вертикально, затем горизонтально до покраснения (обжечь следует и часть держателя).

6.4. Плотнo зажав ватную пробку между мизинцем и ладонью правой руки, повернуть ее вращательным движением и вынуть из пробирки. Держать пробку в этом положении до конца работы, следя за тем, чтобы она не соприкасалась с окружающими предметами.

6.5. Отверстие пробирки должно находиться над



Правила работы с культурами микроорганизмов при исследовании кишечной флоры

пламенем горелки.

Слегка обжечь открытый конец пробирки.

6.6. Ввести петлю внутрь пробирки и охладить её у внутренней поверхности стенки пробирки, иначе горячая петля повредит клетки микроорганизмов. Внести остывшую стерильную петлю в пробирку, взять немного микробной массы и перенести в другую пробирку или на предметное стекло.

6.7. Вынуть петлю, не касаясь стенок пробирки.

6.8. При посеве микроорганизмов в другую пробирку с твердой стерильной питательной средой другую пробирку также открыть в пламени спиртовки и легким движением петли с культурой, не повреждая поверхности твердой среды, сделать посев зигзагообразный или прямой линией. При посеве в жидкую среду с культурой петлю погрузить в среду и слегка встряхнуть.

6.9. После взятия материала конец пробирки снова обжечь над пламенем спиртовки, пробку провести через пламя и только после этого закрыть ею пробирку. В случае загорания пробки внести ее внутрь пробирки и потушить, закрыв рукой.

6.10. Пробирку с вновь посеянными микроорганизмами закрыть в пламени спиртовки, подписать и поставить в термостат для выращивания.

6.11. Снова обжечь петлю в пламени, чтобы уничтожить оставшиеся на ней микроорганизмы.

6.12. Работа с чашкой Петри.

6.12.1. Если культура микроорганизмов выращена в чашке Петри с твердой питательной средой, чашку поставить на стол, рядом с пламенем спиртовки, левой рукой слегка приподнять крышку так, чтобы в образовавшееся отверстие свободно



проходила петля.

6.12.2. Лёгким прикосновением к поверхности среды остудить обожженную петлю и взять колонии (скопления клеток микроорганизмов) культуру объемом с маковое зернышко.

6.12.3. Чашку закрыть, а микроорганизмы использовать либо для приготовления мазка, либо для посева на питательную среду в другой чашке или пробирке.

При распределении суспензии микроорганизмов на поверхности твердой питательной среды в чашке Петри получают чистые культуры микроорганизмов, т.е. изолированные колонии. Более стерильные (чистые) посевы получаются, если чашку Петри держать на ладони левой руки на уровне пламени спиртовки, слегка приоткрывая крышку большим пальцем и мизинцем левой руки. Посев легкими круговыми движениями проводится шпателем (стеклянной палочкой) путем распределения суспензии микроорганизмов по всей поверхности среды в чашке.

6.13. Все манипуляции следует проводить быстро, чтобы не загрязнить культуру в пробирке, а также взятый на исследование материал. Категорически запрещается при взятии микроорганизмов из пробирки или при их посеве, т.е. во время любой манипуляции с микроорганизмами, класть пробку, петлю, открытую пробирку на рабочий стол.



7. СОСТАВЛЕНИЕ ПРОТОКОЛА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

7.1. Укажите наименование и цель работы.

7.2. Опишите правила работы с культурами микроорганизмов.

7.3. Произведите пересев культуры дрожжей из одной пробирки в другую.

7.4. Сделайте вывод о эффективности примененного Вами способа для проведения бактериологических исследований.

8. ПОДГОТОВИТЬ ОТВЕТЫ НА КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

8.1. Каково оборудование учебной микробиологической лаборатории?

8.2. В чем выращивают микроорганизмы в лабораторных условиях?

8.3. В чем хранят чистые культуры?

8.4. Какие культуры называются чистыми?

8.5. Каков порядок посева культур микроорганизмов?



9.ЛИТЕРАТУРА

1. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека . Ростов н/Д : Феникс.
2008. — 231 с.
2. Концепции современного естествознания / И.А. Аистов, П.А. Голиков, В.В. Зайцев. – СПб: Питер, 2005. – 205 с.
3. Биотехнология: учебник / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воронина.- -СПб: ГИОРД, 2008. – 703 с.
4. Проведение лабораторно-практических работ по предмету «Микробиология» для подготовки специалистов по учебной группе профессий «Оператор биотехнологических производств». — Л., 2004. — 48 с.