

Проф. гбн ХРИСТО ЧОМАКОВ

Д-р НЕЛИ ГЕОРГИЕВА

РЪКОВОДСТВО ЗА УПРАЖНЕНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ

София, 2004 г.

РЪКОВОДСТВО ЗА УПРАЖНЕНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
първо издание

автори: проф. дбн Христо В. Чомаков
д-р Нели В. Георгиева

рецензент: проф. дбн Стоян Ст. Влахов

Предпечатна подготовка и печат: УКЦ при ХТМУ

Издател: ХТМУ – София

ISBN 954-8954-39-7

СЪДЪРЖАНИЕ

Предговор	5
Микробиологична лаборатория (Н.Георгиева)	7
Светлинен микроскоп	9
Морфология на микроорганизмите	12
Морфология на бактериите	12
Техника на приготвяне на микроскопски препарати.	
Препарати от живи микроорганизми	13
Трайни микроскопски препарати	17
Просто оцветяване	19
Сложни (диференциални) методи за оцветяване.	20
Видове включения в бактериалната клетка	21
Морфология на актиномицетите	24
Морфология на гъби	26
Нишковидни гъби – плесени	26
Едноклетъчни гъби – дрожди	28
Измерване големината на микроорганизмите (Хр.Чомаков)	29
Стерилизация и видове стерилизация (Н.Георгиева)	32
Хранителни среди за култивиране на микроорганизми	37
Култивиране на микроорганизмите	39
Посевки и пресевки на микроорганизми	39
Изолиране на чисти култури	43
Култивиране на аеробни и анаеробни микроорганизми.....	47
Културални свойства на микроорганизмите.....	49
Количествено определяне на микроорганизми	51
Методи за директно отчитане на микроорганизмите	51
Индиректни (културални) методи	
за определяне броят на микроорганизмите	54
Определяне на бактериална маса	59

Растеж на микроорганизмите при периодично култивиране	59
Влияние на външните фактори върху развитието на микроорганизмите (Хр.Чомаков)	63
Физични фактори	63
Установяване влиянието на температурата върху растежа на микроорганизмите	64
Установяване влиянието на осмотичното налягане върху развитието на микроорганизмите	65
Установяване влиянието на слънчевата светлина върху развитието на микроорганизмите	66
Химични фактори	67
Установяване влиянието на рН на средата върху развитието на микроорганизмите	67
Установяване ефекта от действието на дезинфектанта върху микроорганизмите	68
Биологични фактори	70
Установяване на първично коопериране при бактериите	70
Установяване синтеза на антибиотични вещества при микроорганизмите	71
Определяне на чувствителността на микроорганизмите към антибиотици и химиотерапевтици	73
Установяване вида на метаболизма	77
Установяване вида на катаболизма при микроорганизмите – окислителен или ферментативен	78
Установяване действието на екзоензима амилаза	79
Дишане при микроорганизмите	80
Участие на микроорганизмите в кръговрата на въглерода	83
Алкохолна ферментация (Н.Георгиев)	83
Млечнокисела ферментация (Хр.Чомаков)	84
Смесена и бутандиолова ферментация	88
Ферментация на пектиновите вещества	90
Масленокисела ферментация	91
Ферментация на целулозата	94
Непълно окисление на етанол от оцетнокисели бактерии	97
Участие на микроорганизмите в кръговрата на азота	100
Амонификация	100
Фотосинтезиращи бактерии	104
Микроорганизмите в околната среда	108
Микробиологично изследване на въздуха (Н.Георгиева)	110
Микробиологично изследване на води (Хр.Чомаков)	112
Микробиологично изследване на почви	121
Литература	126

ПРЕДГОВОР

Ръководството за практически упражнения по “Микробиология” е предназначено за студентите от специалност “Биотехнология” в Химико-технологичния и Металургичен Университет. В него са разгледани основните методи на микробиологичната лабораторна техника, които дават възможност да се изучат морфологичните, културални, физиологични и биохимични особености на микроорганизмите.

Студентите, които се подготвят за работа в областта на биотехнологията трябва да усвоят асептиката за да се избегне инфектирането по време на работа. Те не само трябва да знаят, но и да придобият тези умения за работа. Всяко упражнение включва провеждането на един опит, резултатите от който студентите трябва да анализират. С мисълта сме, че по този начин ще спомогнем за развитието на мисловната дейност и направим лабораторните упражнения интересни за студентите. Всяко упражнение има поставена цел, реализирането на която се надяваме да формира у студентите критично мислене и умението да се мисли ясно и точно. Доколко сме успели в това отношение ще покажат получените резултати. Една част от упражненията са свързани с кръговрата на въглерода и азота в природата и с елементите на биосферата – вода, въздух и почва. Тяхното изследване прави възможно използването на ръководството и от студентите еколози.

От авторите

Микробиологична лаборатория

В микробиологичната лаборатория студентите овладяват микробиологичните методи на изследване, запознават се с общите въпроси предвидени в програмата за обучение, провеждат научно-изследователска работа.

Цел на упражнението: Запознаване с оборудването в микробиологичната лаборатория. Правила за работа и техника на безопасност при работа с микроорганизми.

Спецификата на микробиологичната работа изисква работното помещение да бъде изолирано, просторно, светло и сухо. Микробиологичната лаборатория включва няколко помещения: лаборатория за провеждане на микробиологични изследвания, специално ограден бокс за посевки, помещение за миене на посудата и стерилизация. Стените на помещенията трябва да имат цокъл от фаянсови плочки или да са боядисани с блажна боя. Подовете да са покрити с плочки или балатум за лесно извършване на дезинфекция. В близост с чешмата да има съд с дезинфекционна течност за дезинфекция на ръцете при напускане на работа.

Оборудване. Микробиологичната лаборатория се обзавежда със следните мебели, апарати и уреди.

Работни маси. Разполагат се към прозорците с оглед светлината да пада отпред или отляво. Покриват се с материали, удобни за дезинфекция. Необходимите предмети към работните маси са:

- светлинен микроскоп – след работа се прибира в специална кутия,
- предметни и покривни стъкла,
- колба-пръскалка за промиване на препаратите
- гутаторни стъкла с оцветителни разтвори,
- вани за оцветяване на препарати,
- спиртни лампи, сигнален часовник,
- стойка-блокче с бактериологично ухо (йозе), бактериологична игла, шпатула на Дригалски, пинсети,
- филтърна хартия, нарязана на парчета с големина на предметно стъкло, моливи за стъкло или маркери, ножици, скалпел,
- стъклени ванички и цилиндри с дезинфекционна течност за поставяне на употребяваните предметни стъкла и пипети,
- стативи за епруветки и Петриеви стъкла (петри),
- ерленмайерови колби и бежерови чаши за приготвяне на хранителни среди.

Термостати. Апарати за автоматично поддържане на постоянна температура съобразно изисванията на микроорганизмите. Представяват шкафове с двойни стени между които има вода. Водата се затопля с електри-

чески нагревател. Желаната температура се поддържа чрез терморегулатор с контактен термометър.

Хладилник. В него се съхраняват необходимите реактиви, микробни култури и хранителни среди.

Клатачен апарат (термостатиран). Уред за периодично култивиране на микроорганизми.

Шкафове. Служат за съхранение на стерилна посуда, химикали и др.

Стерилизационното отделение се оборудва с : автоклав, сух стерилизатор, електрически котлон, апарат на Кох.

Бокс за стерилна работа, стерилизира се с UV-лампи преди и след работа. В съвременните лаборатории вече се използват и т.нар. ламинар-боксове.

Правила за работа в микробиологична лаборатория.

Техника на безопасност при работа с микроорганизми.

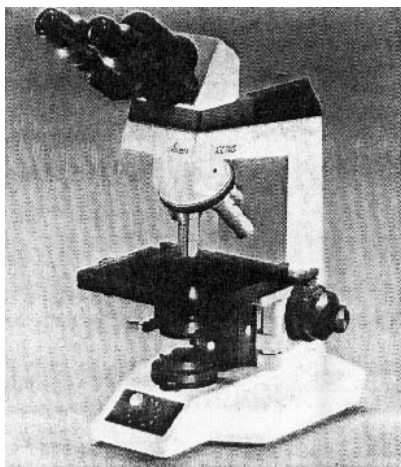
Работата с микроорганизми винаги крие известна опасност за персонала и околните. В микробиологичната лаборатория е трудно да се постигне пълна стерилност. С цел да се унищожат микроорганизмите във въздуха или по различни повърхности, е необходимо да се приложат някои методи за дезинфекция. При дезинфекционната обработка се унищожават патогенните и сапрофитни форми на микроорганизмите. Честото проветряване води до частична дезинфекция на помещението. По-ефективен и често прилаган способ за дезинфекция е облъчване с UV-лампа за определен период. Всички, които работят в микробиологични лаборатории са длъжни да спазват следните правила за работа:

- Забранени са пушенето и храненето в лабораторните помещения,
- Забранено е върху работните маси да се държат чанти и други предмети с изключение само на протоколните тетрадки, в които се вписват резултатите от извършената работа,
- Работи се само с бели престилки,
- Препоръчва се работещия да работи само в седнало положение,
- Да се подреждат правилно предметите върху лабораторните маси преди, по време и след работа,
- Спиртната лампа се запалва само с кибрит,
- Да се поставят замърсените предметни стъкла, пипети и други предмети в специални, съдържащи дезинфекционен разтвор съдове за да бъдат след това стерилизирани,
- При работа с UV-лампа да се поставят защитни очила, в противен случай може да се загуби зрението,
- При работа с уреди под налягане да не се отварят преди да е спаднало налягането,

- След работа със сухия стерилизатор се изчаква да спадне температурата и тогава се отваря, в противен случай може да се възпламени опаковъчната хартия,
- Ръцете да се измиват със сапун и да се обливат с дезинфекционен разтвор всеки път след работа (1% сублимат, 5% лизол, 1-2% хлорамин и др.)

Светлинен микроскоп

Микроскопът е оптичен прибор, предназначен за изучаване на микроскопични обекти (фиг.1).



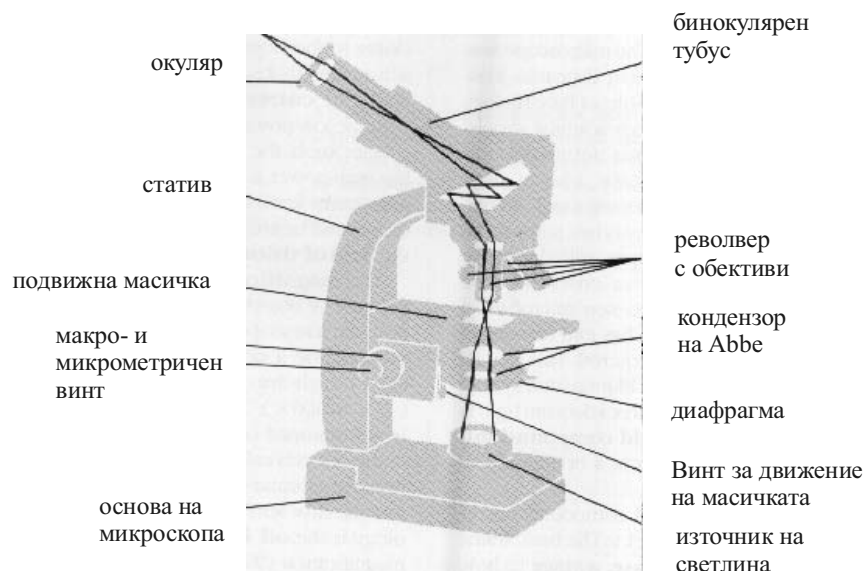
Фиг. 1. Светлинен микроскоп

Цел на упражнението: Изучаване устройството на светлинния микроскоп и особеностите при работа с имерсионната система.

Обикновеният светлинен микроскоп има две системи: механична и оптична. Механичната система се състои от: статив, тубус и предметна масичка (фиг.2).

Стативът поддържа и обединява всички части на микроскопа.

Тубусът представлява тръба с дължина 160 mm. На долната част на тубуса е монтиран револвер, на който са фиксирани обективите. Като се върти револверът спрямо оптичната ос на микроскопа, се сменят обективи с различен показател на увеличение. На горния край на тубуса се поставя съответен окуляр. Придвижването на тубуса, респ. обектива спрямо наблюдавания предмет се реализира с помощта на два винта, монтирани в статива: макровинт, който се използва за бързо придвижване и микровинт, който служи за прецизно фокусиране.



Фиг. 2. Светлинен микроскоп – компоненти

Предметната масичка представлява кръгла или квадратна плоча, върху която се поставя предметно стъкло с наблюдавания обект. С помощта на два винта масичката може да се придвижва в две взаимно перпендикулярни посоки.

Оптичната система се състои от осветителна част, включваща източник на светлина, отражателно огледало, диафрагма и кондензор, и увеличителна част, обединяваща набор от обективи и окуляри. Източникът на светлина може да бъде естествен (непряка слънчева светлина) или изкуствен (вградена в самия микроскоп ел.лампа). Огледалото има плоска повърхност, която се използва при работа с кондензатор и вдлъбната, която се използва при работа без кондензатор. Диафрагмата е разположена между огледалото и кондензора. С нея се регулира количеството светлина чрез намаляване и разширяване на отвърстието.

Кондензаторът на Abbe е съставен от две лещи, фиксирани в конусовидна металическа рамка, посредством които се концентрират разсейващите се и паралелните лъчи. Долната леща е широка, двойно изпъкнала, а горната – плоско изпъкнала.

Обективите са най-важната част на микроскопа. От техните оптични свойства зависи качеството на увеличения образ на наблюдавания обект. Те представляват система от лещи, монтирани в металическа гилза. Фронталната леща е тази, която увеличава, а останалите коригират цветната и сферичната