

**И.В.ЛЕРИНА
А.И.ПЕДЕНКО**



РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРО- БИОЛОГИИ

•ЭКОНОМИКА•

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БОТАНИ

Б. А. БЫКОВ

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ



Издательство «НАУКА» Казахской ССР
АЛМА-АТА-1983

Academy of science of the Kazakh SSR
Dictionary of ecology
by B. A. Bykov

УДК 577.4

Быков Б. А. Экологический словарь. — Алма-Ата: Наука, 1983. — 216 с.

В словаре дано толкование более тысячи терминов, относящихся к экологии в широком ее понимании, — науке об отношениях растительных и животных организмов и образуемых ими сообществ между собой и с окружающей средой, в пределах биоценозов определенных экосистем.

Книга предназначена для экологов и специалистов, занимающихся проблемами использования природных ресурсов, охраны окружающей среды и живой природы.

Ил. 47. Табл. 5.

Ответственный редактор
доктор биологических наук
Л. Я. КУРОЧКИНА

70105—134
Б 407(05)—83 87 83 4602020000

© Издательство «Наука» Казахской ССР, 1983

**И.В.ЛЕРИНА
А.М.ПЕДЕНКО**

РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРО- БИОЛОГИИ

Допущено Министерством торговли СССР в качестве учебного пособия для товароведных и технологических факультетов торговых вузов



МОСКВА «ЭКОНОМИКА» 1980

ББК 36
Л49

Л $\frac{21007-165}{011(01)-80}$ 131—80. 3503000000

© Издательство «Экономика», 1980

ПРЕДИСЛОВИЕ

Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии предназначено для студентов торговых вузов, обучающихся на дневном, вечернем и заочном отделениях по специальностям «Технология и организация общественного питания» (1011) и «Товароведение и организация торговли продовольственными товарами» (1733).

Пособие подготовлено в соответствии с ныне действующей учебной программой по микробиологии, дополняет теоретический курс учебника «Микробиология» (К. А. Мудрецова-Висс. М., Экономика, 1978) и призвано помочь студентам при их подготовке к лабораторным занятиям и проведении практических работ.

Задачами руководства являются:

изучение морфологии и биохимической деятельности важнейших групп микроорганизмов, влияющих на качество пищевых продуктов при их изготовлении, а также в процессе хранения, транспортировки и реализации;

изучение влияния на микроорганизмы различных факторов внешней среды с целью направленного регулирования микробиологических процессов при производстве продуктов питания и их хранении;

ознакомление с основными микробиологическими показателями качества продуктов питания и методами их определения;

ознакомление с содержанием и основными методами санитарной микробиологии, позволяющими определить доброкачественность продуктов питания и санитарное состояние окружающей среды с целью профилактики пищевых заболеваний микробной природы.

Тематика позволяет проводить занятия в соответствии с профилем факультетов и числом учебных часов, предусмотренных программой. Так, на дневном отделении товароведного факультета, где число часов на лабораторные занятия наибольшее (40), выполняются все задания; при этом рекомендуется более полно рассмат-

ривать задачи и методы санитарно-бактериологического контроля пищевых продуктов и объектов внешней среды, поскольку в учебном плане товароведного факультета отсутствует курс гигиены и санитарии предприятий.

На дневном отделении технологического факультета (34 часа) число рассматриваемых тем, а также заданий по некоторым темам может быть сокращено, в частности заданий по темам «Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы», «Санитарно-бактериологический контроль объектов внешней среды». На вечернем и заочном отделениях темы и задания объединяются и частично проводятся как демонстрационные.

Описание каждой лабораторной работы содержит краткое теоретическое пояснение по теме, порядок проведения занятия и методические указания к его выполнению.

Теоретическое введение знакомит студентов с практическим значением и современными требованиями к бактериологическому исследованию данного объекта; для учебных же целей предлагается определение лишь некоторых бактериологических показателей, наиболее характерных для исследуемого объекта. Подобное соотношение теоретических и методических материалов позволяет студенту ориентироваться во всем объеме анализа и оценить его важность с точки зрения будущей практической деятельности.

Выполнение заданий по большинству тем рассчитано на 2—3 занятия, что соответствует этапам (дням) бактериологического анализа.

При проведении лабораторных занятий следует использовать наглядные пособия (муляжи, плакаты, таблицы, диапозитивы), демонстрацию микробиологического оборудования; текущий контроль знаний студентов по ряду тем рекомендуется проводить с использованием различных форм программированного контроля (см. приложение 1).

Ряд лабораторных заданий глав 2, 6, 7, 8 может быть положен в основу научных микробиологических исследований студентов в учебное время и в процессе специализации с целью разработки научно обоснованных рекомендаций для торговли и общественного питания.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Глава 1.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ. МИКРОСКОПЫ И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИИ

1.1. Микробиологическая лаборатория. Правила работы в учебной лаборатории

Микробиологические исследования осуществляются в специальных помещениях, называемых микробиологической лабораторией. Большинство микробиологических анализов проводится в условиях стерильности, что исключает загрязнение исследуемого материала посторонними микроорганизмами из окружающей среды, а также предупреждает загрязнение внешней среды и персонала микробами из исследуемого материала.

В состав микробиологической лаборатории входят лабораторные комнаты для исследования, а также подсобные помещения для подготовки питательных сред и реактивов, мытья посуды, стерилизации и др. Для выполнения работ, требующих стерильности, в одной из лабораторных комнат оборудуют застекленный бокс, снабженный столами лабораторного типа и шкафами для хранения аппаратуры, посуды, реактивов. К основному оборудованию лаборатории относятся микроскопы, термостаты для выращивания микроорганизмов, автоклав, приборы для стерилизации, холодильники.

Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, красителями и другими лабораторными материалами.

ПРАВИЛА РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В ЛАБОРАТОРИИ. Каждый студент имеет в лаборатории постоянное место работы. Рабочее место оборудовано всем необходимым для занятий по микробиологии: биологическим микроскопом, осветителем для микроскопа, штативом

для пробирок, набором красок и химических реактивов, колбой с водой и ванночкой для окраски препаратов. На столе имеется набор предметных стекол для препаратов, пипетки и бактериологическая петля, а также сосуд с дезинфицирующим раствором.

Запрещается: 1) входить в лабораторию в головных уборах и верхней одежде; 2) находиться в лаборатории и работать без халата; 3) курить и принимать пищу, класть на столы посторонние предметы (портфели, сумки, головные уборы и др.). Не допускаются лишнее хождение, резкие движения, способствующие загрязнению исследуемого материала посторонней микрофлорой.

Обязанности студентов во время работы:

1) в начале работы дежурный по группе принимает от преподавателя учебный материал и раздает его студентам;

2) во время работы необходимо: а) бережно обращаться с микроскопом и другими предметами лабораторного оборудования; б) по ходу работы вести запись протокола и зарисовки микроскопической картины в альбом; в) на пробирках и чашках с посевами отметить номер академической группы, номер рабочего места и дату; г) отработанные препараты из живых культур, пипетки, шпатели опустить в сосуд с дезинфицирующим раствором, а петли с остатками культуры обезвредить прожиганием в пламени горелки;

3) по окончании работы необходимо: а) привести рабочее место и микроскоп в исходное состояние; б) все засеянные пробирки и чашки сдать дежурному для помещения в термостат; в) подписать у преподавателя протокол исследования.

1.2. Микроскопы и техника микроскопии

Величина большинства видов микроорганизмов измеряется единицами микрометров ($1 \text{ мкм} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ мм}$), поэтому рассмотреть их и изучить можно только с помощью специальных приборов.

В лабораторной практике наиболее широко используются биологические иммерсионные микроскопы, позволяющие исследовать в проходящем свете в светлом поле микроорганизмы, величина которых не менее 0,2—

0,3 мкм. Применяются также и специальные методы микроскопии, требующие соответствующих оптических устройств или специальных микроскопов: микроскопия в темном поле, фазово-контрастная, люминесцентная, электронная.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИММЕРСИОННЫЙ МИКРОСКОП

Современными моделями биологического иммерсионного микроскопа являются микроскопы серии «Биолам» (используются также микроскопы типа МБИ-1, МБР-1 и др.). Принцип работы указанных микроскопов заключается в получении действительного увеличенного обратного изображения предмета в проходящем естественном или искусственном свете. Микроскопы серии «Биолам» позволяют получить увеличение объекта до 1800 раз (при работе с монокулярной насадкой).

В микроскопе различают две части — механическую и оптическую (рис. 1).

Механическая часть, или штатив, состоит из опорной части — основания микроскопа (1) и тубодержателя (7), на котором укреплены предметный столик (4), кронштейн конденсора (14) и зеркало (19), а в верхней

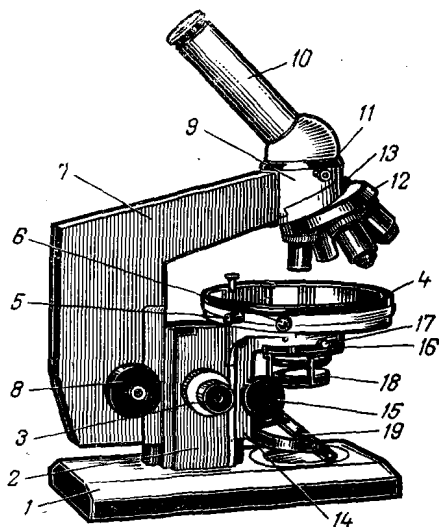


Рис. 1. Микроскоп «Биолам РИВ4.2»:

1 — основание микроскопа; 2 — коробка с механизмом микрометрической фокусировки; 3 — микрометрический винт; 4 — предметный столик; 5, 6 — винты для перемещения столика; 7 — тубодержатель; 8 — макрометрический винт; 9 — головка; 10 — насадка монокулярная (тубус с окуляром); 11 — винт для крепления насадки; 12 — револьвер с объективами; 13 — винт, фиксирующий револьвер относительно оси тубуса; 14, 15 — кронштейн конденсора и его рукоятка; 16 — конденсор с ирисовой диафрагмой; 17 — винт для крепления конденсора; 18 — дополнительная линза; 19 — зеркало

части — головка (9) для насадки с окуляром (10) и револьвер с объективами (12).

Предметный столик служит для закрепления на нем рассматриваемого предмета (препарата). Столик может перемещаться в горизонтальной плоскости с помощью винтов (5, 6), а также вращаться вокруг своей оси, что позволяет привести в поле зрения нужный участок препарата.

Фокусировка препарата достигается перемещением тубуса с помощью механизма, который приводится в движение двумя винтами — макрометрическим (грубая фокусировка) (8) и микрометрическим (тонкая фокусировка) (3). Один оборот микрометрического винта передвигает тубус на 0,1 мм. При вращении винтов по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки — поднимается.

Оптическая часть микроскопа включает две системы: *осветительную* (зеркало, конденсор с ирисовой апертурной диафрагмой и откидной линзой) и *наблюдательную* (объектив и окуляры). Пучок лучей от источника света попадает на зеркало (19), отражается к апертурной диафрагме конденсора, проходит через конденсор (16), исследуемый препарат и попадает в объектив. Объектив дает изображение препарата в плоскости окуляра, который служит для рассматривания увеличенного изображения объекта.

Зеркало имеет две отражающие поверхности — плоскую и вогнутую. Как правило, оно должно быть повернуто к свету плоской стороной; вогнутая поверхность используется редко — при работе без конденсора с объективами малых увеличений.

Конденсор состоит из двух линз, которые собирают параллельные лучи света, отраженные от зеркала, в пучок в плоскости препарата. Конденсор укреплен на кронштейне, может перемещаться с помощью рукоятки (15), снабжен ирисовой диафрагмой, которая предназначена для регулирования интенсивности освещения препарата.

Объектив является основной оптической частью микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния передней (фронтальной) линзы. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем коро-

че фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Расположенные над ней коррекционные линзы служат для получения более четкого изображения (т. е. для устранения дефектов изображения оптических систем — сферической и хроматической аберраций).

В биологических микроскопах серии «Биолам» используются объективы, дающие увеличение в 3, 5, 8, 9, 10, 20, 40, 60, 85 и 90 раз (эти цифры указаны на оправе).

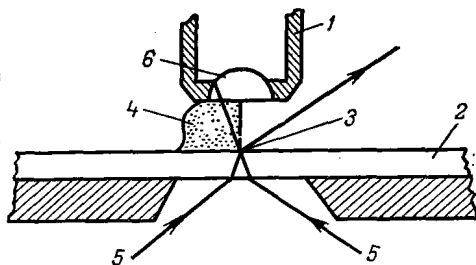
Объективы малого увеличения ($3,5\times$, $8\times$, $9\times$) применяются главным образом для предварительного осмотра препарата, объективы среднего увеличения ($20\times$, $40\times$) — для изучения крупных клеток микроорганизмов (например, грибов); эти объективы называют сухими, поскольку при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При этом благодаря различию показателей преломления воздуха ($n=1$) и стекла ($n=1,52$) часть лучей, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив.

Объективы больших увеличений ($85\times$, $90\times$) носят название иммерсионных.

При работе с ними необходима максимальная освещенность препарата; устранение светорассеивания, неизбежного при работе с сухими объективами, в данном случае достигается путем использования иммерсионных жидкостей, у которых показатель преломления близок к показателю преломления стекла. Каплю жидкости наносят на препарат и погружают в нее объектив. Короткое

Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе:

1 — объектив микроскопа; 2 — предметное стекло; 3 — объект исследования; 4 — иммерсионное масло; 5 — лучи света; 6 — фронтальная линза объектива



фокусное расстояние объективов большого увеличения (1,9—2,1 мм) позволяет исследовать объект не поднимая объектив из капли, что создает однородную оптическую среду между линзой и препаратом (рис. 2).

При работе с объективом 90^x используют кедровое масло, у которого $n=1,515$ (масляная иммерсия); при работе с объективом 85^x используют воду ($n=1,3$).

Окуляр содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирательную (нижнюю). Он увеличивает изображение, данное объективом. Микроскопы системы «Биолам» снабжены окулярами, дающими увеличение 7^x, 10^x и 15^x. Общее увеличение биологического микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра (например, $90 \cdot 15 = 1350$).

Разрешающая способность микроскопа — это минимальное расстояние между двумя точками рассматриваемого предмета, при котором они не сливаются в одну и предмет виден отчетливо (0,21 мкм).

ПРАВИЛА РАБОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИМ ИММЕРСИОННЫМ МИКРОСКОПОМ

УСТАНОВКА СВЕТА. При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ-19, ОИ-35). Используют также обычные лампы накаливания с защитной арматурой.

При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8^x). Объектив опускают на расстояние около 0,5 см от предметного столика и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения всего поля зрения.

МИКРОСКОПИЯ ПРЕПАРАТА. Препарат помещают на предметный столик и укрепляют клеммами. При этом рассматриваемый объект должен быть на поверхности предметного стекла, обращенной к объективу.

Вначале препарат исследуют с объективом 8^x, который опускают с помощью макровинта на расстояние около 0,5 см от препарата. Глядя в окуляр, медленными вращениями макровинта против часовой стрелки получают изображение препарата. Точная фокусировка производится с помощью микрометрического винта, вращение которого допускается в пределах одного оборота.

При переходе на иммерсионную систему в центр препарата наносят каплю иммерсионного масла и, перемещая револьвер по оси, заменяют сухой объектив иммерсионным (о центрированном положении объектива свидетельствует щелчок фиксатора внутри револьвера).

Под контролем глаза (вид сбоку) поворотом макрометрического винта опускают тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Необходимо следить, чтобы фронтальная линза не коснулась предметного стекла и не получила повреждения. Глядя в окуляр, макровинтом слегка поднимают тубус и находят плоскость препарата, а затем с помощью микровинта добиваются фокусировки изображения.

По окончании работы поднимают тубус, снимают с предметного столика препарат, опускают конденсор и тщательно удаляют масло с фронтальной линзы иммерсионного объектива, пользуясь сухой хлопчатобумажной салфеткой.

МИКРОСКОПЫ ДЛЯ СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (ПРИНЦИП МИКРОСКОПИИ)

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые неокрашенные микроорганизмы, а при использовании дополнительных приспособлений к микроскопу — наблюдать и фотографировать размножение микробных клеток. Для проведения фазово-контрастной микроскопии используют обычный биологический иммерсионный микроскоп, в котором оптическую часть (объектив, окуляр и конденсор) заменяют специальным устройством (КФ-1, КФ-4), превращающим изменения световой волны по фазе (фазовые изменения возникают при прохождении световой волны через прозрачные объекты) в изменения по амплитуде, которые улавливаются глазом. В результате живые прозрачные объекты становятся контрастными, хорошо видимыми глазом.

Микроскопия в темном поле достигается с помощью специального конденсора (типа ОИ-13), которым заменяют обычный конденсор микроскопа. Метод основан на освещении объекта косыми лучами света, которые не попадают в объектив, и поэтому поле зрения выглядит

черным. Детали препарата (например, микроорганизмы) частично отражают лучи и становятся видимыми, даже если их диаметр намного меньше разрешающей способности объектива. Следовательно, микроскопия в темном поле позволяет увидеть объекты (рассмотреть их контуры), лежащие за пределами видимости обычного микроскопа.

Люминесцентная микроскопия основана на просмотре микроорганизмов в собственном свете, возникающем под действием ультрафиолетовых (длина волны 300—400 нм) или коротких синих лучей (длина волны 460 нм).

Поскольку свет люминесценции объекта имеет большую длину волны, чем свет возбуждающий, под влиянием коротких синих лучей возникает люминесценция в цветовой гамме видимого спектра (зеленая, желтая, красная). Длина волны излучаемого света (люминесценция) зависит от физико-химических свойств вещества.

Изучение первичной (собственной) люминесценции микробов проводится редко, потому что это свечение характеризуется малой интенсивностью и требует специальных приборов для регистрации; чаще используют вторичную, или наведенную, люминесценцию, которая возникает после окраски препарата люминесцирующими красителями — флюорохромами. Этот метод обладает рядом преимуществ перед обычными, основными из которых являются высокая контрастность изображения и, следовательно, возможность выявлять в исследуемом материале бактерии в небольших концентрациях. Отечественной промышленностью выпускаются люминесцентные микроскопы типа МЛ-1, МЛ-2 и др.

Люминесцентная микроскопия находит все более широкое практическое применение в пищевой микробиологии (при диагностике порчи фруктов, овощей, картофеля, для оценки качества и обнаружения дефектов различных пищевых продуктов, при диагностике пищевых заболеваний микробной природы).

Электронная микроскопия при работе с биологическими объектами позволяет получить полезное увеличение объекта до 500 000 и более раз при разрешающей способности менее 25 А (2,5 нм) и даже 15 А (1,5 нм). В микробиологии этим методом исследуют вирусы и

тончайшие структуры микробной клетки. В электронном микроскопе изображение объекта достигается с помощью потока движущихся в вакууме электронов, источником которых является электронная «пушка». В качестве линз, фокусирующих электронный пучок на объекте, используется магнитное поле; роль предметного стекла выполняют проникаемые для электронов материалы (например, тонкая пленка коллодия или углерода).

Изображение выявляется на флюоресцирующем экране или фотопластинке благодаря разной плотности деталей объекта для потока электронов.

**Задание для лабораторной работы:
микробиологическая лаборатория;
биологический микроскоп
и правила микроскопии**

Вопросы для обсуждения: 1. Оснащение, организация и задачи микробиологической лаборатории. Обязанности студентов при работе в лаборатории. 2. Современные методы микроскопии. Устройство биологического иммерсионного микроскопа, его возможности при микробиологическом анализе.

Самостоятельная работа студентов: 1. Работа с биологическим иммерсионным микроскопом. Овладение приемами микроскопии при просмотре препаратов дрожжей. 2. Просмотр демонстраций.

Методические указания: 1. Изучая устройство биологического микроскопа, особо отметить приемы освещения препарата, установку препарата в фокус объектива и последовательность настройки при переходе от сухого объектива к иммерсионному. Просмотреть с иммерсионным объективом окрашенные фуксином препараты дрожжей и зарисовать их в альбом. Подрисуночная подпись должна включать название исследуемого объекта, увеличение микроскопа, способ окраски. 2. Демонстрация включает ознакомление с электронограммами бактериальной клетки и вирусов, а также просмотр препаратов в люминесцентном и фазово-контрастном микроскопах.

Глава 2.

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Приготовление препаратов микроорганизмов

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом необходимо приготовить специальные препараты. Существуют различные методы приготовления препаратов, выбор которых зависит от объекта, а также цели исследования.

Микроскопическому анализу подвергают препараты живых и убитых (фиксированных), окрашенных и неокрашенных микроорганизмов.

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах толщиной не более 1,2—1,4 мм. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена (например, хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой, обжиганием поверхности стекла в пламени горелки). Для приготовления препаратов живых микроорганизмов применяют дополнительно покровные стекла (толщина до 0,17 мм), которыми накрывают препарат. Чистые стекла хранят в сухом состоянии или в обезжиривающих жидкостях.

ПРЕПАРАТЫ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Живые клетки микроорганизмов можно рассматривать под микроскопом в неокрашенных (нативных) препаратах и препаратах, окрашенных прижизненно.

Прижизненное исследование микробов применяется в практических лабораториях весьма ограниченно: из-за малой контрастности живых клеток этот метод пригоден для изучения морфологии только крупных микробов, например микроскопических грибов; в прижизненных препаратах бактерий исследуют главным образом подвижность клеток.

Существуют два основных способа приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов: препарат «раздавленная капля» и «висячая капля».