

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО Горский ГАУ)

ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

(Раздел 2. Структурно-морфологические
особенности и систематика клеток
микроорганизмов)

Методические указания к выполнению
лабораторных и практических занятий
для студентов по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

Владикавказ 2024

УДК 579 (075.32)
ББК 28.4я723

Составители:

Цугкиев Б.Г., Айлярова М.К., Рамонова Э.В., Кабисов Р.Г.

Рецензент:

Кцоева Ирина Ирбековна, к.б.н., доцент кафедры ветеринарии
и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Горский ГАУ

Общая биология и микробиология. Раздел 2. Структурно-морфологические особенности и систематика клеток микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторных и практических занятий по дисциплине для студентов по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология / Составители: Б.Г. Цугкиев, М.К. Айлярова, Э.В. Рамонова, Р.Г. Кабисов - Владикавказ: ФГБОУ ВО Горский ГАУ, 2024. – 80 с.

Методические указания определяют алгоритм работы в микробиологической лаборатории, помогают овладеть техникой микробиологических исследований, знакомят с морфологией наиболее распространенных групп микроорганизмов.

Рассматриваются основные методы микроскопии в микробиологической практике и навыки работы с культурами микроорганизмов, имеются темы: микробиологическая лаборатория и правила работы в ней; микроскопия; изучение микроорганизмов в светлом поле микроскопа; специальные методы окраски. После каждой темы приведены вопросы для самоконтроля.

Методические указания подготовлены по дисциплине «Общая биология и микробиология» для студентов по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования – программа (бакалавриата.)

Рекомендовано УМС ФГБОУ ВО Горский ГАУ в качестве Методического указания к выполнению лабораторных и практических занятий *9 декабря 2024 г. протокол № 3.*

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания для проведения лабораторных и практических занятий знакомят студентов с организацией работы в микробиологической лаборатории, правилами работы с культурами микроорганизмов.

В качестве объектов исследования при выполнении работ используются культуры микроорганизмов, широко распространенных в природных средах, участвующих в биогеохимических циклах превращения веществ в биосфере, используемых в различных отраслях производства. Приведены обобщенные данные отличительных признаков эукариотических и прокариотических организмов.

Основное внимание уделено освоению студентами способов подготовки препаратов для светлой микроскопии.

После каждой темы приведены вопросы для самоконтроля.

Методические указания к выполнению лабораторных и практических занятий по дисциплине «Общая биология и микробиология» (Раздел 2. Структурно-морфологические особенности и систематика клеток микроорганизмов) предназначены для студентов по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология (очное, заочное).

В результате освоения лабораторных и практических занятий по морфологии микроорганизмов студент должен знать:

- морфологию основных групп микроорганизмов;
- правила работы в микробиологической лаборатории;
- основные методы проведения микроскопических исследований;
- методику приготовления и окрашивания микроскопических препаратов.

Конечной целью обучения студентов данным методам лабораторных и практических исследований является формирование умений и мировоззрения о многообразии биологических объектов при подготовке высококвалифицированных специалистов, способных в будущем решать производственные проблемы, в соответствии с современными научными представлениями.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1

Тема. Общая характеристика живых систем

План

1. Морфология бактерий
2. Морфология цианобактерий
3. Морфология актиномицетов
4. Морфология грибов
5. Морфология микроводорослей
6. Морфология простейших

Контрольные вопросы

Мир микроорганизмов включает огромное разнообразие форм, общим свойством которых является их малый размер – от десятых долей микрометра (мкм) до десятков, иногда сотен микрометров. Большинство микроорганизмов – одноклеточные, встречаются ценочитные, многоклеточные, однако дифференциация клеток на органы и ткани у них отсутствует.

На основании современных представлений о молекулярной организации клеток высшие таксоны живой природы относят к трем надцарствам и шести царствам (табл. 1).

В системе живых организмов микроорганизмы занимают особое положение. В отличие от растений и животных, которые относятся к одному надцарству эукариоты, микроорганизмы относятся к трем надцарствам.

При этом к надцарствам акариотов и прокариотов относятся только микроорганизмы.

К царству растений относятся микроорганизмы – микроскопические водоросли, к царству животных – простейшие.

Таблица 1

Система высших таксонов живой природы

Надцарства	Царства
Акариоты (безъядерные)	Вирусы
Прокариоты (доядерные)	Архебактерии
	Цианобактерии
	Эубактерии
Эукариоты (ядерные)	Растения
	Животные
	Грибы

Естественными средами обитания микроорганизмов является почва, вода, организм человека, животных, растений. Воздух не является благоприятной средой для развития микроорганизмов, так как не содержит капельно-жидкой воды, однако многие микроорганизмы могут временно сохранять жизнеспособность в воздухе.

Почва является местом обитания разнообразных видов бактерий, водорослей, грибов, простейших. Численность и видовой состав микроорганизмов, населяющих почву, определяется наличием влаги, питательных веществ, реакцией среды, температурой, степенью аэрации. Численность и видовое разнообразие микроорганизмов водных объектов определяется прежде всего степенью загрязненности воды, наличием в ней органических соединений и биогенных элементов, азота, фосфора и др. В природных водоемах могут развиваться водоросли, бактерии, простейшие и грибы.

Микроорганизмы – это мельчайшие живые существа, величина которых в большинстве случаев не превышает 0,1 - 0,2 мм, что делает их невидимыми для человеческого глаза без увеличения. Мир микробов, населяющих нашу планету, велик и разнообразен. Они различаются между собой морфологически, а также физиологическими и биохимическими свойствами. По принципу клеточной организации все микроорганизмы могут быть разделены на два типа - прокариоты и эукариоты. У прокариот ядерный аппарат, называемый часто нуклеоидом, представлен кольцевой молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. У эукариот ядро содержит набор хромосом и отделено от цитоплазмы мембраной. Различия в организации ядерного аппарата коррелируют с рядом других особенностей эу- и прокариот (табл. 2). Первоначально к микроорганизмам относили и вирусы, однако в настоящее время их чаще рассматривают как особые формы жизни, не имеющие клеточного строения и содержащие, в отличие от про- и эукариот, лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК).

Таблица 2

Некоторые отличительные признаки эукариот и прокариот

Характеристика	Прокариоты	Эукариоты
Цитологические признаки:		
Наименьший размер клетки – 0,2 мкм	+	-
Наличие оформленного ядра	-	+
Наличие автономных органелл (митохондрии, хлоропласты)	-	+
Локализация рибосом:		
распределены в цитоплазме	+	-
прикреплены на эндоплазматическом ретикулуме	-	+
Жгутики (если присутствуют):		
диаметр 0,01—0,02 мкм, формула среза 8+1	+	-
диаметр около 0,2 мкм, формула среза 9+2	-	+
Молекулярно-биологические особенности:		
Число хромосом	1	>1
Кольцевая хромосома	+	-
Линейные хромосомы	-	+
Признаки, основанные на химических анализах:		
Присутствие пептидогликана	+(-)	-
Особенности размножения:		
Клеточное деление происходит в результате митоза	-	+
Возможность мейоза	-	+
Перенос генов и рекомбинация включают гаметогенез и образование зигот	-	+
Питание:		
Диффузия или транспорт через мембрану	+	+
Эндоцитоз	-	+
Метаболические особенности	+	
Дыхательный и фотосинтезирующий аппарат ассоциирован с плазматической мембраной - или ее выростами	+	-
Возможность хемолитотрофного метаболизма	+	-
Способность к фиксации молекулярного азота	+	-
Способность к метаногенезу	+	-
Способность к анаэробному фотосинтезу	+	-

1. Морфология бактерий

Бактерии представлены в основном одноклеточными формами с прокариотическим типом строения клетки. Размножение бактерий осуществляется путем поперечного деления клетки на две равные части. Клетки после деления могут разъединяться, однако у некоторых видов остаются вместе, образуя различные сочетания. Эти скопления не эквивалентны многоклеточным формам, так как каждая входящая в них клетка является самостоятельным организмом, сохраняющим жизнеспособность и после отделения от других клеток. По форме клеток бактерии подразделяют на четыре основные группы: палочковидные, кокковидные, извитые и нитевидные.

Палочковидные бактерии имеют форму палочек. Различаются разнообразием величины, форм и расположением клеток. Размеры варьируют от 2-5 мкм до 10-12 мкм. Палочки различаются отношением длины клетки к ширине, формой окончания (полюса) клетки. Концы их могут быть ровными, как бы обрезанными, закругленными, утолщенными или заостренными.

Взаимное расположение различно: беспорядочное, характерное для большинства бактерий, клетки которых после деления расходятся; парами - диплоформы, сохраняют после деления две клетки; в виде длинных цепочек.

Среди палочковидных форм есть подвижные и неподвижные. Движение бактерий зависит как от видовой принадлежности, так и от возраста культуры и условий выращивания. Для выявления подвижности препараты готовят из односуточных культур. Подвижные палочковидные бактерии перемещаются при помощи жгутиков, которые осуществляют вращательное движение и по-разному располагаются на микробной клетке (рис. 1).

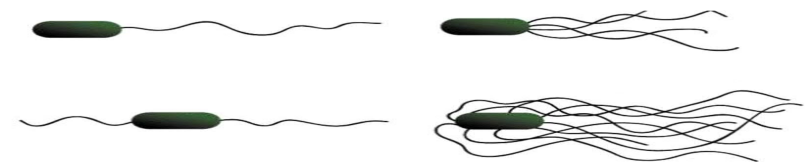


Рис. 1. Схематическое изображение типа жгутикования у бактерий: 1 – монотрихи – один жгутик; 2 – лофотрихи – пучок жгутиков на одном из концов клетки; 3 – амфитрихи – по одному или пучку жгутиков на обоих полюсах клетки; 4 – перитрихи – жгутики расположены по всему периметру.

По способности образовывать споры палочковидные бактерии подразделяют на три большие группы - бактерии (лат. *Bacterium*), не образующие спор, бациллы (лат. *Bacillus*), образующие эндоспоры без изменения формы клетки, и клостридии (лат. *Clostridium*), у которых в процессе спорообразования наблюдается изменение формы клетки и из палочковидной она превращается в веретеновидную или утолщенную с одного конца, напоминающую барабанную палочку (рис. 2).

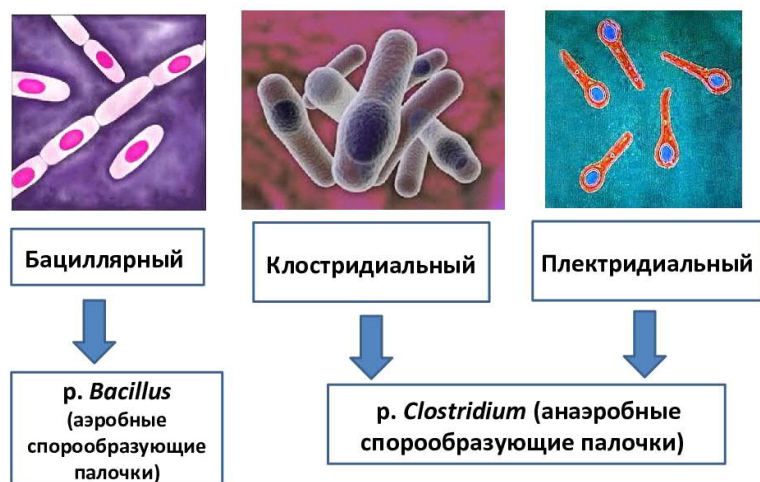


Рис. 2. Типы спорообразования

В каждой клетке образуется только одна спора; когда спора сформируется, оболочка и содержимое клетки лизируются. Споры бактерий хорошо переносят высушивание, нагревание, воздействие ряда химических веществ. Попадая в благоприятные условия, спора прорастает в вегетативную клетку. Палочковидные бактерии могут располагаться по одной без определенной системы, быть попарно связанными по длине или образовывать цепочки.

Кокковидные формы (лат. *coccus* - шарик) характеризуются отсутствием подвижности и способности к спорообразованию.

Могут быть шаровидной формы, слегка вытянутой или несколько вогнутой с одной из сторон, диаметром 0,5-1 мкм.

В зависимости от расположения клеток и характера их деления кокки подразделяют на несколько морфологических групп (рис.3). Микрококки характеризуются одиночным беспорядочным расположением клеток, диплококки (лат. *diplos* - двойной) характеризуются расположением клеток попарно, стрептококки (греч. *streptos* - цепь) имеют вид цепочки, состоящей из отдельных шарообразных клеток. Такие расположения клеток возможны при делении их в одной плоскости. У тетракокков (греч. *tetra* - четыре) деление клетки возможно в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, в результате чего клетки располагаются по четыре. У сарцин (лат. *sarcio* - связывать) образуются скопления по 8, 16 и более клеток в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Стафилококки (греч. *staphylos* - гроздь) - скопления неправильной формы, напоминающие виноградные гроздья; образуются в результате деления клетки в различных плоскостях.

Многие бактерии образуют капсулу снаружи клеточной стенки, представляющую скопление слизистого вещества (полисахариды, полипептиды). В зависимости от размера различают микрокапсулу и макрокапсулу. При микроскопировании капсулированных бактерий капсулы имеют вид бесцветного ореола, окружающего клетки, так как вещество капсул плохо воспринимает красители.

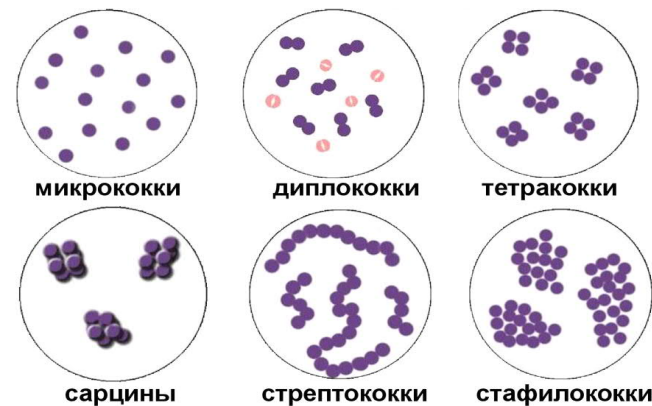


Рис. 3. Кокковидные формы бактерий

Извитые (спиральные) формы бактерий. К этой группе бактерий относятся вибрионы, спириллы и спирохеты (рис.4).

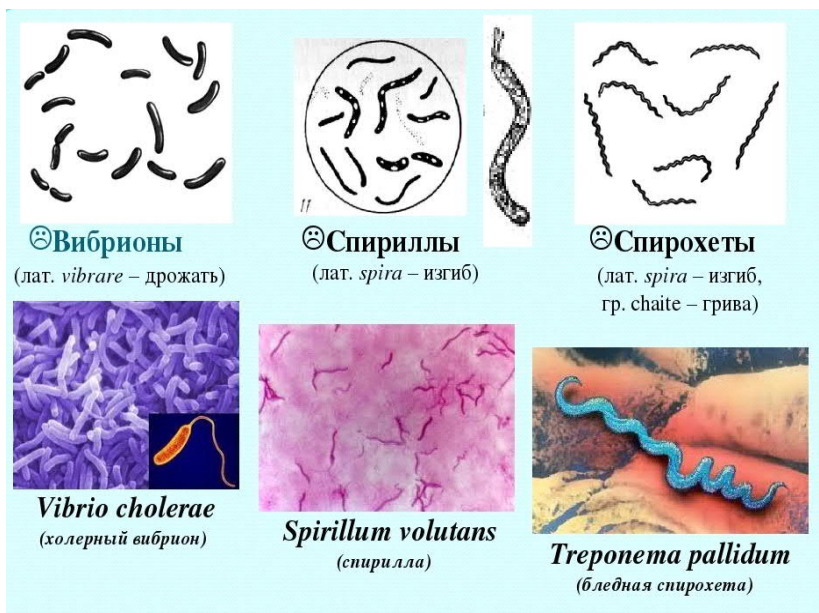


Рис. 4. Извитые (спиральные) формы бактерий

Вибрионы (лат. *vibrio* – изгибающийся): слегка изогнутые клетки, в виде запятой, изгиб их составляет 1/4 завитка спирали, подвижность осуществляется за счет жгутика.

Спириллы (лат. *spira* – изгиб) отличаются спиральным строением клетки с одним или несколькими оборотами спирали, способные к движению с помощью биполярно расположенных жгутиков.

Различаются по количеству и характеру изгибов, общей длине и толщине клетки.

Характерную в морфологическом отношении группу составляют спирохеты. Строением клеток и способом передвижения они отличаются от всех других бактерий. Клетка спиралевидная, но не ригидная, как у спирилл, а чрезвычайно гибкая. В сравнении с длиной (5-500 мкм) толщина ее необычно мала (0,1-0,6 мкм). Большинство спирохет подвижны, они могут извиваться, перемещаться в жидкой среде путем вращательных и легких волнообразных движений. Движение спирохет обусловлено сокращением фибрилл, плотно обвива-

ющих цилиндрическую клетку и расположенных под клеточной стенкой. Каждая фибрилла прикреплена одним концом вблизи одного из полюсов клетки, другой ее конец свободен. У различных представителей этой группы число фибрилл варьирует и более или менее пропорционально величине клетки - у мелких форм к каждому полюсу прикреплено по 1-2 фибриллы, у крупных - до нескольких сотен. Спирохеты размножаются поперечным делением, при этом каждая клетка получает один из двух наборов фибрилл; новый набор фибрилл формируется на вновь образованном полюсе каждой из дочерних клеток.

Эндоспоры у извитых форм не обнаружены.

Бактерии нитевидной формы представляют собой нити из цилиндрических или дисковидных клеток, часто окруженных общим чехлом. Длина нитей может достигать 500 мкм, они могут быть как прямыми, так и скрученными в спирали, у некоторых форм нити плоские, похожи на ленты. Нитевидные бактерии могут быть разветвленной формы. Боковые выросты представляют собой ложное ветвление, так как они образуются за счет вытеснения клеток из основной нити при делении. Это многоклеточные колониальные организмы, не имеющие функционального разделения между клетками. Нитевидные бактерии - водные организмы, где они могут свободно плавать или прикрепляться к твердым субстратам, в последнем случае на конце нити образуется слизистая подушечка. Размножаются нитевидные бактерии путем фрагментации с образованием отдельных коротких цепочек, путем отщепления отдельных скользящих клеток от апикального конца нити, а также гонидиями, представляющими собой клетки овальной формы, образующиеся внутри материнской клетки. Гонидии некоторых нитевидных бактерий имеют жгутики, при помощи которых передвигаются. Нитевидные бактерии встречаются среди представителей различных физиологических групп – есть нитевидные формы среди серобактерий, железобактерий, цианобактерий.

Микроскопические исследования бактерий проводят на фиксированных препаратах с иммерсионной системой. Спириллы и спирохеты плохо воспринимают красители, поэтому после фиксации мазка в пламени горелки проводят его обработку в течение 3-5 мин 0,5%

раствором соляной кислоты. Протравливание клеток кислотой повышает их восприимчивость к красителю. Мазок окрашивают в течение 1-2 мин фуксином Циля.

Нитевидные бактерии - достаточно крупные формы; для их микроскопирования можно приготовить препарат «висячая капля» и использовать сухую систему.

2. Морфология цианобактерий

Цианобактерии (прежнее название синезеленые водоросли) - прокариотические организмы - относятся к бактериям, но, подобно растениям и водорослям, осуществляют фотосинтез с выделением кислорода, т.е. они относятся к аэробным окисленным фотолитоавтотрофам (рис.5). Цианобактерии распространены в водоемах, в почве, на рисовых полях. В эвтрофных озерах часто наблюдается массовое размножение цианобактерий - «цветение» воды. Благодаря способности фиксировать молекулярный азот и выдерживать экстремальные условия (температура, pH) цианобактерии первыми заселяют места, бедные питательными веществами (пустыни, скалы и т.п.) и участвуют в первичном почвообразовательном процессе.

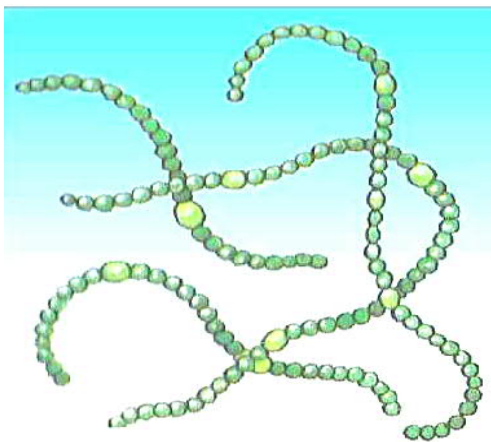


Рис. 5. Цианобактерии (синезеленые водоросли)

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа и включает как одноклеточные, так и многоклеточные формы. Одноклеточные формы – это палочки, кокки, которые часто существуют в виде объединенных капсулами и слизью клеток в агрегаты (колонии).

Размножаются бесполом путем в результате бинарного, множественного деления или почкования.

Многоклеточные формы – это нитчатые бактерии, представлены цепочками клеток, называемых трихомами, часто погруженных в слизистые чехлы. Размножаются путем деления клеток внутри трихома. В некоторых нитчатых цианобактериях, растущих в отсутствие связанного азота и фиксирующих молекулярный азот, наблюдается дифференциация клеток.

Образуются гетероцисты клетки с толстой клеточной стенкой, слабо пигментированные (рис.6). Они являются местом фиксации молекулярного азота. Образуются также покоящиеся клетки акинеты - клетки с утолщенной стенкой.



Рис.6. Гетероцисты *Nostoc*

3. Морфология актиномицетов

Актиномицеты (греч. *actis* - луч, *mycos* - гриб) - лучистые грибки - группа микроорганизмов, относящаяся к прокариотам, но имеющая некоторое сходство с грибами. Как и бактерии, все актиномицеты содержат в составе клеточной стенки пептидогликан, не имеют

дифференцированного ядра, ширина клеток (0,5-1,5 мкм) сходна с бактериальными. Сходство с грибами проявляется в способности клеток ветвиться в виде мицелия и образовывать на концах гиф споры, являющиеся для ряда родов актиномицетов основным способом размножения.

Низшие формы актиномицетов – **проактиномицеты и коринеформные бактерии** – включают такие роды как *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* и др. Это одноклеточные формы, у которых наблюдается тенденция к образованию мицелия или клеток с изменчивой неправильной формой в молодых культурах. С возрастом клетки большинства видов распадаются на кокковидные или овальные формы. Плеоморфизм (морфологическое многообразие) характерен для всех видов, размножение происходит путем деления клеток, фрагментации мицелия или образования спор. Так, у некоторых видов микобактерий споры формируются из отдельных фрагментов цитоплазмы, покрываются собственной оболочкой; по мере их созревания оболочка материнской клетки разрушается, и споры освобождаются. В клетках таких микобактерий всегда образуются несколько спор, поэтому для представителей этого рода спорообразование можно рассматривать как способ размножения. Практическое применение из этой группы микроорганизмов нашли многие виды рода *Corynebacterium*, являющиеся продуцентами аминокислот. Кроме плеоморфизма, для коринобактерий характерно «защелкивание» клеток при их делении. Оно происходит из-за того, что соединяющая дочерние клетки перегородка расслаивается на разных сторонах с разной скоростью, так что клетки оказываются под углом друг к другу. Наряду с этим наблюдается и множественное деление клеток, при котором из одной длинной палочки получается несколько коротких (рис.7).

Истинные актиномицеты или **эуактиномицеты** объединяются в несколько родов. Один из них - род *Streptomyces*. Эти микроорганизмы образуют сильно разветвленный мицелий, не имеющий поперечных перегородок, он частично врастает в питательную среду, образуя плотный субстратный мицелий, который трудно отделяется бактериологической петлей.

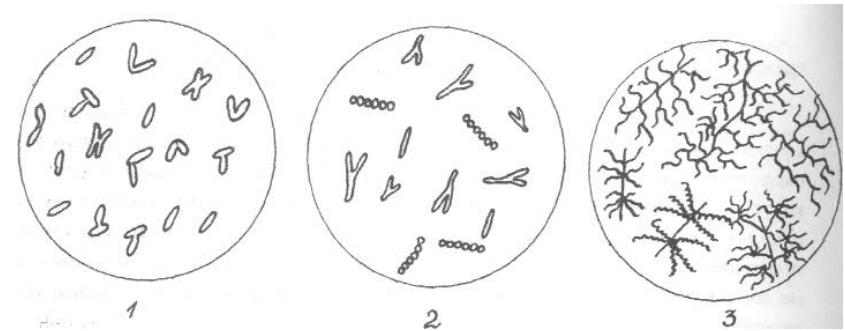


Рис. 7. Актиномицеты: 1 - коринебактерии; 2 - микобактерии; 3 - стрептомицеты - мицелий и форма спорофоры

Над поверхностью субстрата образуется воздушный мицелий. Имеются особые воздушные гифы (спорофоры), от которых отщипываются споры, служащие для распространения вида. Строение этих спорофор (прямые, волнистые, спиральные, собранные в пучки, мутовчатые и т.д.) служит одним из систематических признаков стрептомицетов. Споры стрептомицетов неустойчивы к нагреванию, однако в сухом состоянии могут длительное время сохранять жизнеспособность. Мицелий у истинных актиномицетов сохраняется в течение всего жизненного цикла, расчленения с возрастом на кокки и палочки не наблюдается. Многие стрептомицеты образуют пигменты, окрашивающие колонии в самые разные цвета, часто пигменты выделяются в среду. Большинство стрептомицетов продуцируют биологически активные вещества с антибиотическими свойствами, некоторые из которых нашли применение в медицине (стрептомицин, тетрациклины и т.д.).

Культуры стрептомицетов, выращенные на питательной среде в чашках Петри, изучают непосредственно на чашке при малом увеличении (объектив 10х), помещая открытую чашку на предметный столик микроскопа. При этом можно видеть, что гифы мицелия частично внедряются в субстрат, частично стелются по поверхности и приподнимаются над ней. Просматриваются спорофоры со спорами. Из этих же культур готовят препараты для микроскопического изучения: на предметное стекло наносят каплю 10% раствора

щелочи (KOH или NaOH), или 70 - 90% раствора уксусной кислоты, или 60% этанола, в которой расщепляют с помощью двух препаративных игл мицелий, взятый с небольшим кусочком подлежащей питательной среды. Препарат плотно накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом 40×. На таком препарате хорошо видна разница в толщине субстратных и воздушных гиф, форма спораносцев. Для изучения типа спорообразования, формы и размера спор готовят препарат «отпечаток». Для приготовления такого препарата покровное стекло плотно прижимают к поверхности колонии, а затем покровное стекло помещают на предметное стекло в каплю воды отпечатком вниз; микроскопируют с объективом 40×.

4. Морфология грибов

Грибы – это эукариотические организмы, составляют царство *Mycota* (рис.8). Среди грибов встречаются одноклеточные, нитчатые и мицелиальные формы.

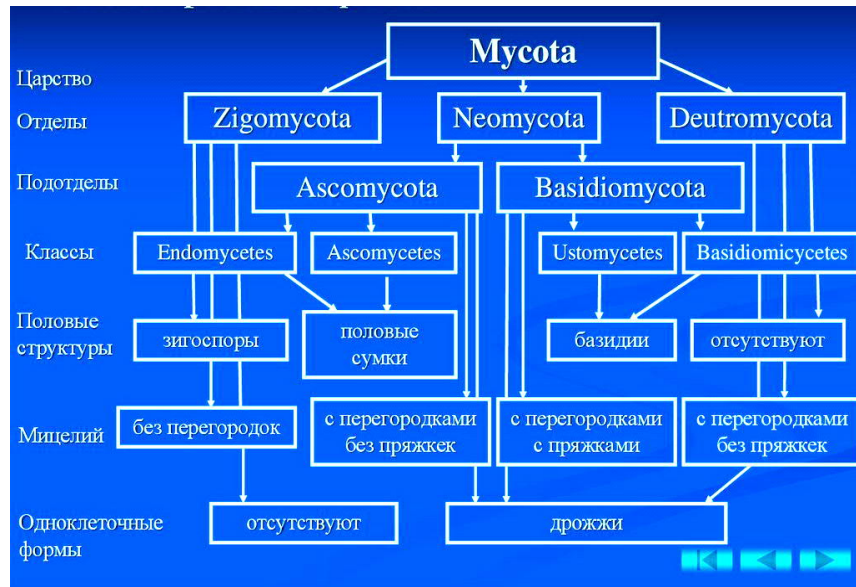


Рис. 8. Структура царства грибов

Большинство грибов - ценоцитные организмы с вегетативной структурой, называемой мицелием. Мицелий состоит из многоядерной массы цитоплазмы, наполняющей сильно разветвленную систему жестких трубочек примерно одинаковой толщины (~5 мкм). Обычно мицелий образуется путем прорастания и разрастания одиночной репродуктивной клетки-споры. Грибная спора дает длинную нить или гифу, которая удлиняясь, многократно ветвится и образует целую систему нитей, т.е. мицелий. Рост грибов осуществляется за счет кончиков гиф и может продолжаться до тех пор, пока хватает питательных веществ; у некоторых грибов мицелий может занимать участок почвы до 15 м в диаметре (рис.9). Мицелий грибов может быть одноклеточным (несептированным) и многоклеточным (септированным). Грибы могут размножаться вегетативным, бесполом и половым путем.

Грибы распространены в природе повсеместно. Споры грибов обнаруживаются в любых экосистемах, техногенных потоках и продуктах.



Рис. 9. Морфология грибов

Наибольшее количество грибов встречается в почве. Они принимают активное участие в биогеохимическом цикле превращений углерода в природе и относятся как к зимогенной, так и автохтонной микрофлоре.

Среди большого разнообразия грибов, приспособившихся к жизни в почве, имеется небольшая группа водных грибов, а также довольно обширная группа паразитических грибов, вызывающих заболевания человека, животных и растений (микозы).

Грибы способны выделять во внешнюю среду ферменты и абсорбтивным путем поглощают питательные вещества, продукты ферментативного гидролиза природных биополимеров и других растворимых веществ. Такой тип питания определяет положение почвенных грибов как самую крупную экологическую группу, участвующую в минерализации органических веществ в экосистемах.

К царству *Mycota* (или *Fungi*) относятся миксомицеты (истинные слизевики), низшие грибы фикомицеты (или зигомицеты) и высшие грибы (или эумицеты), которые распределены по классам: аскомицеты, базидиомицеты и несовершенные грибы (рис.10).

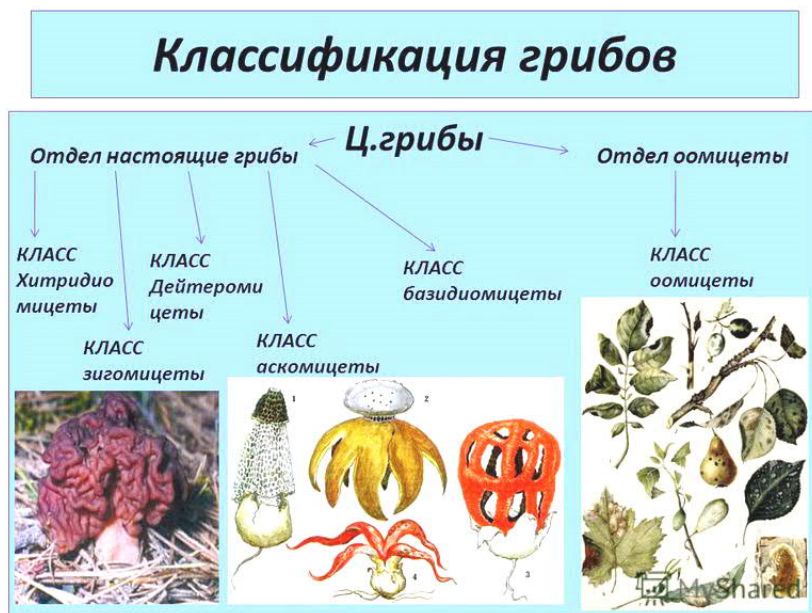


Рис. 10. Классификация грибов

Зигомицеты – низшие грибы, имеют хорошо развитый несептированный мицелий. Отсутствие перегородок в мицелии определяет

его многоядерность (ценоцитный мицелий). Типичный представитель фикомицетов *Mucog pusillus* развивается в виде войлоковидного налета серого цвета. Его мицелий образует структуры двух типов - разветвленные гифы (ризоиды), проникающие в субстрат, и поднимающиеся вверх над пучками ризоидов особые воздушные гифы - спорангиеносцы, расширяющиеся на верхушке, образуя округлый спорангий. Спорангий отделяется перегородкой от остальной части спорангиеносца. Внутри спорангия развивается большое количество сферических эндоспор, служащих для размножения. Это бесполой способ размножения.

У зигомицетов существует и половой способ размножения, сопровождающийся образованием зигоспор. У гомоталлических форм зигоспоры образуются в результате слияния половых клеток, образующихся на одном и том же мицелии; у гетероталлических форм различают два вида мицелия, не отличающихся морфологически и обозначаемых как (+) и (-). Зигоспоры образуются только при контакте гиф (+) с гифами (-). При прорастании зигоспоры происходит мейоз и появляется гифа, образующая спорангий.

Аскомицеты – высшие грибы, имеющие многоклеточный ветвящийся мицелий. Клеточные перегородки имеют поры, что обуславливает ценоцитную природу цитоплазмы. У аскомицетов различают два способа размножения: половой и бесполой. При половом способе слияние двух ядер приводит к образованию зиготы, которая превращается в аск (сумку), внутри него в результате деления диплоидного ядра образуются гаплоидные аскоспоры, их может быть от четырех до 1000 и более. При бесполом способе размножения на концах плодоносящих гиф - конидиеносцах - образуются экзоспоры - конидии.

К аскомицетам относятся многие виды плесневых грибов и дрожжей. Виды рода *Penicillium* используются при получении антибиотиков. Пенициллы размножаются в основном бесполом путем, конидии образуются на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, напоминающих кисть руки (отсюда и название пенициллов - кистевики).

Представители рода *Aspergillus*. Конидиеносцы у аспергиллов обычно одноклеточные, шаровидной, булавовидной или грушевидной формы. На них располагаются параллельно друг другу короткие кег-

леобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает цепочки конидий. Вся головка конидиеносца напоминает наконечник лейки со струйками воды, поэтому гриб называют леечным. Представители рода *Aspergillus* используются как продуценты лимонной кислоты и ферментов.

Особую группу среди аскомицетов составляют **дрожжи** – одноклеточные грибы, утратившие способность к мицелиальному росту. Клетки дрожжей могут быть округлой, овальной, палочковидной, грушевидной, лимоновидной формы. При половом способе размножения две клетки сливаются, образуется зигота, которая превращается в аск. В аске формируются 2-12 и более спор. Количество спор и их форма (округлые, серповидные, овальные и т.д.) рассматриваются как систематические признаки, определяющие видовую принадлежность. При прорастании из каждой споры образуется вегетативная клетка дрожжей.

Вегетативный способ размножения у дрожжей может осуществляться по способу почкования, деления и смешанным типом – почкующимся делением. Для сахаромицетов (род *Saccharomyces*) характерно размножение почкованием, когда на материнской клетке возникает выпуклость – почка – или дочерняя клетка, которая постепенно увеличивается в размерах и отделяется. Дрожжи широко используются человеком в хлебопечении, при получении вина, спирта, пива.

Шизосахаромицеты (род *Schizosaccharomyces*) размножаются делением.

При вегетативном способе размножения почки образуются только полярно, по концам клетки, причем отделение почки сопровождается образованием перегородки между нею и материнской клеткой. Используют при производстве некоторых сортов пива.

Базидиомицеты – наиболее высокоразвитая группа грибов, объединяющая все шляпочные грибы. Органы спороношения – базидии – клетки на концах гиф, содержат, как правило, четыре гаплоидных базидиоспоры, отделяющиеся от базидии путем отшнуровывания. Мицелий базидиомицетов многоклеточный, многоядерный, отличить его от мицелия аскомицетов можно по наличию пряжек – особых мицелиальных отростков крючкообразной формы, располагающихся над клеточными перегородками. Возникновение пряжек у базидиомицетов сопровождает процесс деления ядер и клеток.

Несовершенные грибы (дейтеромицеты) – большая группа грибов, включающая как одноклеточные (дрожжи), так и многоклеточные мицелиальные формы. Общим для всех грибов этого класса является отсутствие половой стадии при размножении. Из одноклеточных дейтеромицетов дрожжи рода *Candida* широко применяются в микробиологической промышленности. Они используются при получении белково-витаминного препарата, органических кислот, многоатомных спиртов; представители этого рода принимают участие в очистке сточных вод, являясь компонентами активного ила, участвуют в очистке почвы и морской воды от нефтяных загрязнений. Дрожжи р. *Candida* размножаются многосторонним почкованием, большинство видов образуют псевдомицелий. Псевдомицелий часто бывает дифференцирован на псевдогифы и бластоспоры. Бластоспорами у дрожжей называют вегетативные споры, образующиеся путем почкования на псевдомицелии. Они обычно круглой или овальной формы и располагаются по отношению к псевдомицелиальным клеткам в определенном порядке, образуя или цепочки, или мутовки.

К несовершенным грибам относятся также широко распространенные в природе виды дрожжей р. *Rhodotorula*, отличающиеся желтой или красной окраской за счет содержания каротиноидов. Их применяют для обогащения полученной биомассы провитамином А.

К многоклеточным дейтеромицетам относятся виды р. *Fusarium*, р. *Oidium* и др. Большинство представителей этих грибов являются фитопатогенными.

Род *Fusarium* отличается серповидно изогнутыми многоклеточными конидиями, которые развиваются на коротких разветвленных конидиеносцах.

Род *Oidium* характеризуется наличием сильно разветвленного мицелия, гифы которого легко распадаются на оидии – отдельные клетки, служащие для размножения. Один из видов этого рода – *Oidium lactis* или молочная плесень часто встречается в виде бархатистой пленки на поверхности кисломолочных продуктов, вызывая их порчу.

Изучение морфологических особенностей представителей мицелиальных грибов проводят вначале при малом увеличении (10×) непосредственно на чашках Петри. Затем с помощью препаративной иглы вырезают кусочек мицелия (~ 0,5 мм²) и осторожно помещают его в каплю воды на предметное стекло. Сверху на мицелий кладут

покровное стекло. Если вода не целиком окружает исследуемый мицелий, следует из капельницы добавить ее под покровное стекло до полного погружения мицелия. Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой. При малом увеличении находят конидиеносцы, хорошо видимые на краях препарата. Их детальное строение изучают с объективом 40×. У фикомицетов спорангии обычно разрушаются при просмотре таким способом и видны лишь скопления спор. Для выявления неразрушенных спорангиев следует осторожно взять препаративной иглой небольшое количество мицелия и другой иглой снять его на сухое предметное стекло. Просматривая препарат без покровного стекла при малом увеличении, можно видеть спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах - спорангии.

5. Морфология микроводорослей

Микроводоросли подобно высшим растениям являются фотосинтезирующими организмами, осуществляют фотосинтез с выделением кислорода.

Основным местом обитания водорослей являются водоемы, но многие обитают в наземных экосистемах: в почве, на коре деревьев и др.

Многие водоросли – одноклеточные микроорганизмы, другие – нитчатые, колониальные или ценоцитные формы, третьи - многоклеточные, с дифференцировкой клеток и тканей, аналогичной высшим растениям.

В основу классификации водорослей положены в основном различия в свойствах клеток, а не организма: в частности, различия в природе фотосинтезирующих пигментов, запасных питательных веществ, химического состава клеточной стенки, наличия подвижной стадии при их развитии, в количестве, строении, расположении жгутиков у подвижной формы. Поэтому к одним и тем же таксономическим группам водорослей могут относиться как одноклеточные формы, так и многоклеточные растениеподобные, например, в группе зеленых и красных водорослей.

Объектами исследования микробиологов являются в основном одноклеточные формы - представители подвижных форм, жгутиковые, и неподвижных, диатомовые и десмидиевые. И те и другие фор-

мы составляют основную массу планктона, принимают участие в процессах самоочищения природных водоемов, очистки сточных вод в очистных сооружениях (биологические пруды, поля фильтрации, поля орошения), способствуют освобождению стоков от соединений азота и фосфора, обогащают воду кислородом, в природных условиях массовое развитие микроводорослей приводит к так называемому «цветению» водоемов. Культивирование микроводорослей методами биотехнологии осуществляется с целью получения биомассы биологически активных веществ в структуре системы жизнеобеспечения в космических кораблях.

Эвглена (*Euglena gracillus*) – типичный представитель подвижных форм обладает выраженной полярностью: у нее вытянутая листовидная форма клетки, на переднем конце которой имеются два жгутика. Вблизи основания жгутиков имеется специализированная органелла - глазок - окрашенный особыми каротиноидами в красный цвет. Это фоторецептор, определяющий направление движения клетки к свету. Форма клетки изменчива, так как вместо жесткой клеточной стенки имеется эластичная пленка пелликула. Размножение осуществляется путем продольного деления (рис.11).

Хлорелла (*Chlorella vulgaris*) – зеленая водоросль, вегетативное тело которой окружено клеточной стенкой из целлюлозы и имеет округлую форму. Клетки одиночные, либо образуют бесформенные скопления. Размножение осуществляется с помощью автоспор, образующихся внутри клетки и высвобождающихся при разрыве оболочки (рис.11).

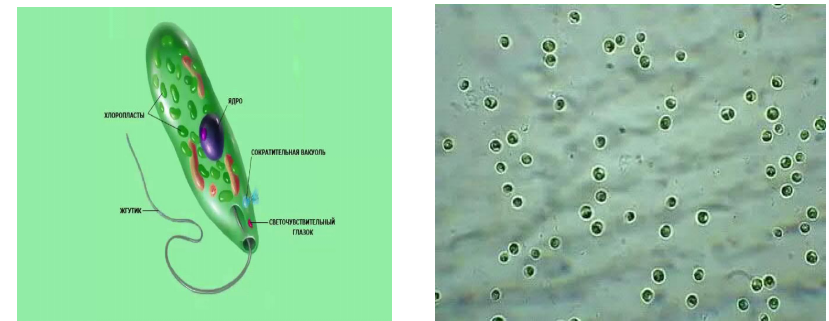


Рис. 11. Микроводоросли
1 - *Euglena gracillus*; 2 - *Chlorella vulgaris*

6. Морфология простейших

Простейшие (*Protozoa*) – это микроскопические одноклеточные животные, эукариоты. Обитают в воде, почве, многие паразитируют в организме позвоночных и беспозвоночных животных.

У большинства простейших клетка дифференцирована на переднюю и заднюю части, имеется ротовое отверстие, одно или два ядра, принимающих участие в делении.

Размножаются простейшие бесполом (делением клетки) или половым путем (в результате конъюгации клеток).

Классификация простейших основана на способах движения: в класс саркодовые (амебовидные) (*Rhizopoda*) объединены виды, передвигающиеся с помощью псевдоподий; у жгутиковых (*Mastigophora*) подвижность обусловлена одним или несколькими жгутиками, движение инфузорий (ресничные - *Ciliata*) осуществляется за счет координированной системы ресничек; неподвижные формы простейших объединены в класс спорозоидов (*Sporozoa*).

Для активной жизни простейших в почве важнейшее значение имеет наличие воды в почвенных порах. Периоды иссушения переживают в виде цист. Численность простейших в почве может быть очень высокой – до нескольких сотен тысяч клеток в 1 г почвы. Существенным фактором, регулирующим жизнь простейших в почвах, является количество бактерий, которыми они питаются.

Представители саркодовых (или корненожки) не имеют постоянной формы клетки из-за образования в различных ее участках псевдоподий, временных цитоплазматических выростов, либо в виде широких лопастей, либо узких, заостренных. Псевдоподии служат как для движения, так и для захвата пищи.

Сталкиваясь с бактериальной или дрожжевой клеткой, амeba обтекает ее и включает внутрь цитоплазмы (фагоцитоз).

Размножаются амeba путем деления клетки в любом направлении.

Инфузории (ресничные, *Ciliata*) – одна из наиболее многочисленных и морфологически разнообразных групп простейших. Для этой группы характерна дифференциация тела, это вершина дифференциации на одноклеточном уровне. Инфузории в основном обитают в водоемах. Большое морфологическое разнообразие характерно для инфузорий. Многие представители имеют форму эллипса, поверхность

которого покрыта тонкими ресничками. Типичным представителем этой группы является инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*).

Простейшие входят в состав почвенных биоценозов, активных илов, используемых в процессах биологической очистки сточных вод. Питаясь бактериями и взвешенными веществами, они способствуют осветлению воды. Простейшие выполняют функцию индикаторов: по развитию тех или других форм можно судить о качестве очистки стоков.

Так, преобладание амeb и отсутствие в составе активного ила инфузорий свидетельствует о плохой работе очистных сооружений, а отсутствие амeb и преобладание инфузорий – хорошей работе очистных сооружений. Инфузория *Tetrahymena pyriformis* широко используется в качестве тест-объекта для первичной оценки токсичности и биологической ценности разного рода продуктов. Форма других представителей этого класса напоминает бутоны растений. Реснички спиралеобразно окружают ротовое отверстие, движение осуществляется за счет сокращения, как самой клетки, так и стебельков, с помощью которых они могут прикрепляться к субстрату; есть одиночные и колониальные формы (рис.12).

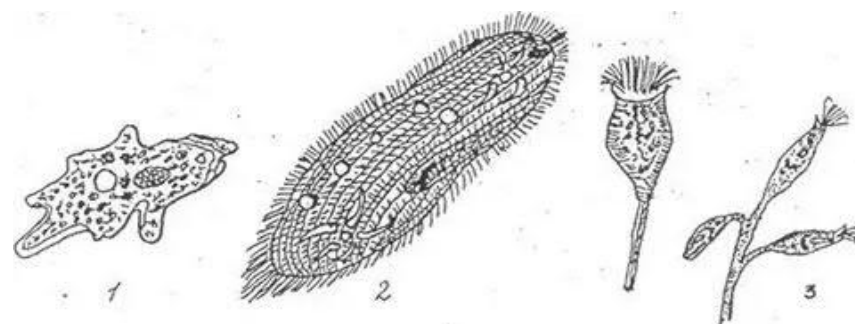


Рис. 12. Простейшие:
1 - амeba; 2 - инфузория; 3 - сувойки

Контрольные вопросы

1. Какими параметрами определяется морфологическая характеристика микроорганизмов?
2. Морфология основных групп бактерий.

3. Морфология и таксономия микроорганизмов, имеющих сферическую форму.

4. Морфология и таксономия бактерий, имеющих цилиндрическую форму.

5. Морфология и таксономия бактерий, имеющих извитую форму.

6. Типы спорообразования.

7. Типы жгутикования.

8. Низшие формы актиномицетов.

9. Отличия и сходные черты актиномицетов, эубактерий, микроскопических грибов.

10. Рост и размножение микроскопических грибов.

11. Основные признаки дрожжей.

12. Цианобактерии. Особенности морфологии, размножения.

13. Морфология микроводорослей.

14. Типичные представители микроводорослей.

15. Морфология простейших.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №2

Тема. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней

План

1. Подготовка микробиологической лаборатории к работе
 2. Правила работы в микробиологической лаборатории
 3. Правила работы с культурами микроорганизмов
- Контрольные вопросы

1. Подготовка микробиологической лаборатории к работе

Деятельность любого микробиолога связана с популяциями (культурами) микроорганизмов, состоящих из миллионов особей. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют *чистой*. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название *смешанной*. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Ввиду того что в воздухе и на поверхности предметов (на столах, инструментах, одежде), а также на руках, волосах и т. д. всегда имеется большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Требование чистоты культур в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Под лабораторные комнаты отводят наиболее светлые, просторные помещения, естественное освещение которых должно составлять не менее 110 лк. Поверхность столов и пол всех лабораторных помещений покрывают легко моющимся материалом - пластиком или линолеумом, а стены на высоту 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской. Основное рабочее помещение оборудовано столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения аппаратуры, посуды и реактивов. Столы имеют подводку электроэнергии и снабжены газовыми горелками.

Кроме основного рабочего помещения лаборатория имеет стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, бокс,

моечную, холодильную комнату, термостаты или термостатированные комнаты для выращивания микроорганизмов, помещение для хранения культур и т. д. Бокс служит для пересевов микроорганизмов и представляет собой небольшую изолированную комнату, разделенную перегородкой на две части. Входят в рабочее помещение бокса через тамбур с раздвижной дверью, что исключает резкое перемещение воздуха и, следовательно, занесение извне посторонних микроорганизмов. Оборудование бокса состоит из стола, стула, газовой горелки и бактерицидной лампы, укрепленной в специальном штативе или смонтированной на потолке бокса. Удобно иметь в боксе подсобный стол, на котором размещают необходимые во время работы предметы.

Широко используют настольные боксы разных конструкций - от камер с полностью открытой передней панелью до герметически закрытых камер, работа в которых осуществляется под отрицательным воздушным давлением с помощью прикрепленных к передней панели резиновых перчаток. В некоторых боксах («ламинарах») чистота атмосферы рабочего пространства обеспечивается циркулирующей стерильного воздушного потока внутри камеры.

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. В ней не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Для этого применяют различные способы дезинфекции. Слово «дезинфекция» означает обеззараживание, т. е. уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды. Однако при дезинфекционной обработке погибают не только патогенные, но и сапрофитные бактерии. Иногда процесс дезинфекции оказывает стерилизующее действие.

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории обрабатывают пылесосом и протирают растворами различных дезинфицирующих веществ. Обработка пылесосом обеспечивает освобождение предметов от пыли и удаление с них значительного количества микроорганизмов. Установлено, что при 4-кратном проведении щеткой пылесоса по поверхности предмета с него удаляется примерно 47% микроорганизмов, а при 12-кратном - до 97%. В качестве дезинфици-

рующих растворов чаще всего пользуются 2-3%-ным раствором соды (бикарбоната натрия), 3-5%-ным раствором фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5-3%-ным водным раствором хлорамина и некоторыми другими дезинфектантами.

Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30-60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха - облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызвать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов.

Воздействие ультрафиолетовых лучей должно быть непосредственным и длительным. Это связано прежде всего с тем, что ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способностью. Они не проходят, например, через обычное стекло, легко поглощаются частицами пыли. Кроме того, некоторые предметы, такие как белая бумага, пластины из полированного алюминия или хрома, могут заметно отражать ультрафиолетовые лучи. Поэтому в зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов.

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются бактерицидные лампы. Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления. Более 80% испускаемого ими спектра приходится на волны длиной 254 нм. Обычно бактерицидные лампы представляют собой трубки различного диаметра и длины, изготовленные из специального стекла, пропускающего излучение с длиной волны 254 нм. Каждая трубка вмонтирована в корпус-держатель и может быть снабжена отражателем. Необходимо иметь в виду, что ультрафиолетовые лучи могут вызвать тяжелые поражения глаз. Поэтому *при работе с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза*. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе

находиться нельзя. Следует также учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается. В этих случаях облучение целесообразно вести с перерывами.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, 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 или этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. 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.

2. Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, что определяется двумя основными положениями:

1. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов, т.е. популяции микроорганизмов одного вида, часто являющихся потомством одной клетки. Поскольку в воздухе, на поверхности окружающих нас предметов, на одежде, руках, волосах всегда имеется большое количество разнообразной микрофлоры, то для обеспечения стерильности исследований и избежания загрязнения культур работа должна проводиться с соблюдением правил асептики.

2. При исследованиях с неидентифицированными микроорганизмами, при их выделении из объектов окружающей среды и техногенных потоков, могут быть выделены патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Кроме того, клетки как сапрофитных, так и патогенных микроорганизмов могут являться аллергенами для определенных индивидуумов.

То есть для получения достоверных результатов исследований,

для обеспечения личной безопасности и безопасности окружающих, необходимо соблюдение определенных правил.

Подготовку лаборатории к занятиям проводит лаборант. Студенты, выполняя задания, должны соблюдать следующие правила:

1. Каждый студент в микробиологической лаборатории работает на постоянном месте, выполняя задания индивидуально.

2. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов (в том числе портфелей и сумок).

3. Студенты должны работать только в чистых халатах, волосы должны быть подобраны, не падать на плечи.

4. При работе с культурами микроорганизмов необходимо строго соблюдать все правила микробиологической техники. На пробирках, колбах, чашках Петри, матрацах должна быть сделана надпись, содержащая родовые и видовые названия культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы.

5. Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели).

6. Все засеянные пробирки, чашки помещаются в термостат или сдаются лаборанту. Отработанный материал (пробирки, чашки Петри) также помещается в определенные емкости по указанию лаборанта для их дальнейшего обеззараживания.

7. В лаборатории запрещается курение, лишнее хождение по лаборатории, не разрешается хранить и употреблять еду, напитки, жевательную резинку.

8. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, вымыть руки. Необходимо иметь индивидуальное полотенце, салфетки для вытирания рук.

Каждый студент ведет журнал лабораторных работ, являющийся документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных. Записи проводятся в определенной последовательности и должны содержать следующее:

1. Номер работы. Ее название. Дата постановки и окончания опыта.

2. Объект исследования.

3. Условия проведения опыта, включая методы анализов.

4. Полученные результаты и выводы из них.

При изучении морфологии культур делают их зарисовки при определенных увеличениях микроскопа, что указывается в тетради; цифровые данные обобщают в таблицах, графиках, диаграммах.

3. Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и в жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри (рис. 13). Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют.

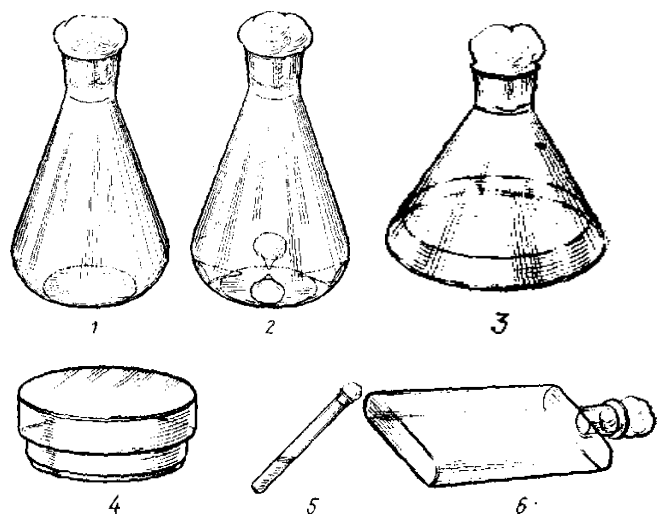


Рис. 13. Посуда для культивирования микроорганизмов:
1 - качалочная колба; 2 - качалочная колба с отбойниками;
3 - коническая колба; 4 - чашка Петри; 5 - пробирка; 6 - матрас.

Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется *посевом*, или *инокуляцией*. Посев микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Перед посевом следует тщательно надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают чернилами по стеклу или на наклеенной этикетке.

Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей или иглой (рис. 14), если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, когда нужно приготовить препарат или пересеять культуры микроорганизмов, выросшие в жидкой питательной среде, лучше пользоваться не петлей, а стерильной пипеткой.

Бактериологические петли и иглы делают, используя тонкую проволоку из вольфрама или нихрома, которую закрепляют в металлическом или стеклянном держателе. Диаметр бактериологической петли – 4 - 5 мм.

Бактериологическую петлю (иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которую будут вводить внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени горелки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно раскалена на всем протяжении.

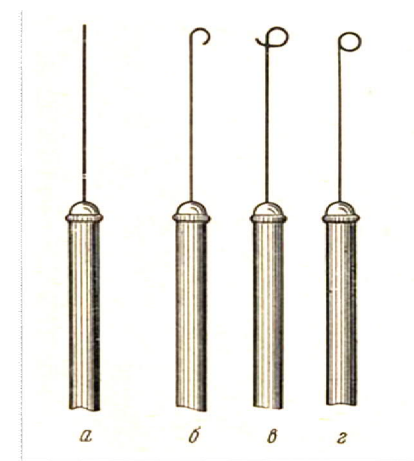


Рис. 14. Бактериологическая игла и бактериологическая петля:
а - игла; б и в - неправильно сделанные петли; г - правильно сделанная петля.

При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (рис. 15), поэтому не следует опускать петлю непосредственно к горелке. Сразу

же после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю (иглу) вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

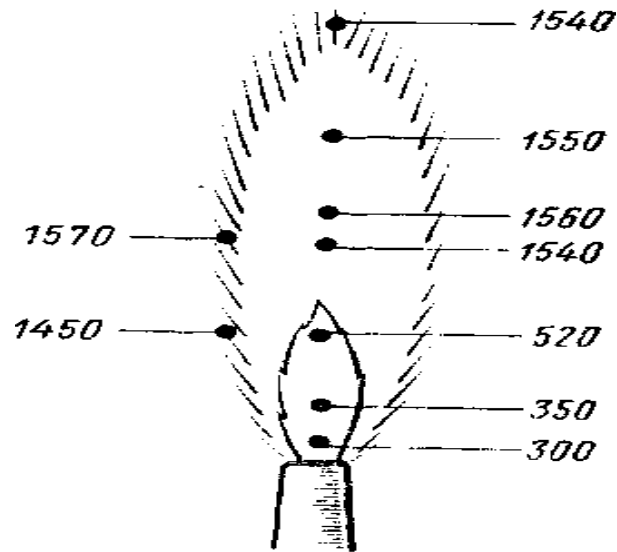


Рис. 15. Значение температуры (в градусах Цельсия) в разных участках пламени газовой горелки

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом. Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю так, как держат карандаш, и прокалывают в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время последующих манипуляций. Край открытой пробирки с культурой микроорганизмов обжигают в пламени горелки и после этого вводят в пробирку стерильную петлю. Взяв небольшое количество микробной массы с

поверхности субстрата, вынимают петлю из пробирки, следя за тем, чтобы переносимый материал не касался стенок или краев пробирки. Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают ватную пробку и закрывают ею пробирку. Если конец ватной пробки загорится, то не следует бросать пробку. Ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет. Ни в коем случае нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это только усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует снова вставлять ее в пробирку. Нужно взять новую стерильную пробку и начать всю операцию заново. Закрытую ватной пробкой пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата или для пересева культуры в свежую среду.

Если культуру пересевают на скошенную агаризованную среду, то петлю вводят в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, проводят снизу вверх либо зигзагообразную, либо прямую черту-штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды. В случае пересева в жидкую среду (в колбы или пробирки) петлю с микробной массой погружают непосредственно в среду. Оставшиеся на петле после пересева или приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени горелки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокалывают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим, потому что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокалывания петлю можно положить на место.

Из жидкой среды клетки берут следующим образом: пипетку за верхний конец вынимают из бумаги или пенала, в которых ее стерилизовали, и вводят в пробирку или колбу с культурой, соблюдая все правила предосторожности, описанные выше. Отбирать жидкую культуру пипеткой можно с помощью резиновой груши. Исползованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 3-5%-ный водный раствор фенола или 2%-ный раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

Когда необходимо провести рассев микроорганизмов из жидкой питательной среды на поверхность плотной среды в чашке Петри, поступают следующим образом. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. Для этого сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и средним пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (20-30 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды наносят каплю или «петлю» жидкой культуры, которую осторожно распределяют стеклянным стерильным шпателем (шпатель Дригальского) (рис. 16) либо петлей.

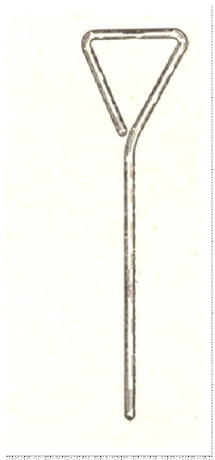


Рис. 16. Шпатель Дригальского

Все описанные манипуляции следует проводить около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. После пересева пробирку или другие сосуды, в которых выращивают микроорганизмы, помещают в термо-

статы, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура. Посуду с культурами микроорганизмов, подлежащими выбрасыванию, следует автоклавировать, чтобы убить клетки, и только после этого мыть. Культуры на плотных питательных средах можно заливать на сутки дезинфицирующим раствором, после чего их выбрасывают и посуду моют. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются понятия: «чистая», «смешанная» и «инфицированная» культура микроорганизмов?
2. Перечислите дезинфицирующие растворы, используемые в микробиологической практике?
3. Назовите основные правила работы в микробиологической лаборатории.
4. Какие помещения и оборудование включает микробиологическая лаборатория?
5. Как осуществляется отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной (жидкой) среде?

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №1

Тема. Микроскопия

План

1. Светлопольная микроскопия
2. Микроскопия в темном поле
3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством
4. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия
5. Электронная микроскопия

Контрольные вопросы

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величина которых измеряется в большинстве случаев микрометрами ($\text{мкм}=0,001\text{мм}=10^{-6}\text{м}$), возможно только с помощью микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световая микроскопия) и десятки тысяч (электронная микроскопия) раз. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные элементы его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст).

Световая микроскопия включает:

- обычную просвечивающую микроскопию (светло- и темнопольную),
- фазово-контрастную,
- люминесцентную.

1. Светлопольная микроскопия

Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов. Внешний вид и принципиальное устройство одного из них (микроскоп биологический рабочий, МБР-1) приведены на рисунке 17. Подобные микроскопы позволяют определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также характерную для микроорганизмов способность к дифференцирующему окрашиванию. Рассмотрим некоторые особенности оптической системы светового микроскопа на примере МБР-1, так как от знания их зависит успех наблюдения объекта и надежность получаемых результатов.

Оптическая часть микроскопа включает:

- осветительный аппарат,
- объектив,
- окуляр.

Механическая часть включает:

- штатив,
- предметный столик,
- клеммы,
- тубус,
- револьвер,
- систему винтов для передвижения элементов микроскопа.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора и предназначен для наилучшего освещения препарата. Регулируемое зеркало укреплено у основания штатива и имеет две стороны: вогнутую и плоскую. Вогнутое зеркало собирает и концентрирует в плоскости препарата пучок лучей, идущих от источника света, поэтому им пользуются только в тех случаях, когда работают без конденсора, т. е. с очень малыми увеличениями.

При работе с конденсором, который рассчитан на использование параллельных лучей, следует пользоваться только плоской стороной зеркала. Конденсор, укрепленный непосредственно над зеркалом, состоит из нескольких линз и предназначен для собирания параллельных лучей света, идущих от источника света и отраженных плоским зеркалом, в одной точке - фокусе, который должен находиться в плоскости препарата. В конденсор вмонтирована ирисовая (апертурная) диафрагма, позволяющая задерживать излишние лучи света и регулировать апертуру конденсора. Под конденсором находится откидная оправа для светофильтра.

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Объектив состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Самая главная - наружная (фронтальная) линза, от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Увеличение объектива всегда обозначено на его оправе. От увеличения объектива зависят еще две его характеристики - рабочее расстояние, т. е. расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата при сфокусированном

объекте, и площадь поля зрения. Чем больше увеличение объектива, тем меньше его рабочее расстояние и поле зрения (табл.3).

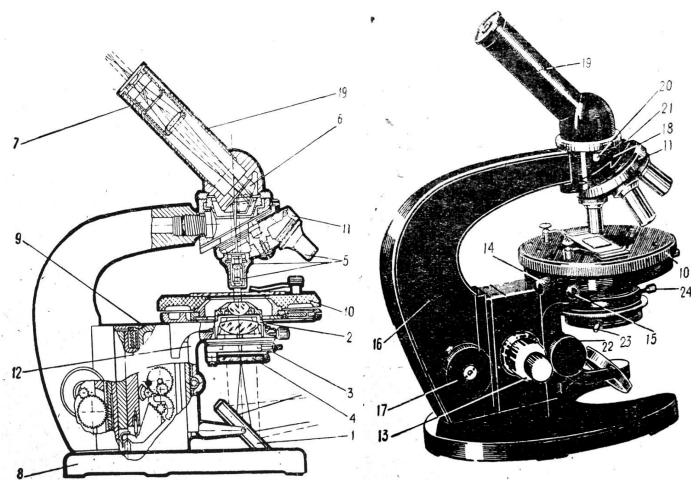


Рис. 17. Микроскоп МБР-1:

- 1 - зеркало; 2 - конденсор; 3 - ирисовая апертурная диафрагма; 4 - съемный светофильтр; 5 - объективы; 6 - призмы; 7 - окуляр; 8 - подковообразное основание микроскопа; 9 - коробка с микрометрическим механизмом; 10 - предметный столик; 11 - револьвер; 12 - кронштейн конденсора; 13 - рукоятка микрометрического винта; 14, 15 - винты для перемещения предметного столика; 16 - тубусодержатель; 17 - рукоятка макрометрического винта; 18 - головка с клиновой направляющей для револьвера; 19 - наклонный тубус; 20 - винт для крепления тубуса; 21, 22 - рукоятка перемещения кронштейна конденсора; 23 - рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 24 - винт, укрепляющий конденсор в гильзе.

Таблица 3

Оптические данные объективов микроскопа МБР-1

Система	Собственное увеличение	Числовая апертура	Фокусное расстояние, мм	Свободное рабочее расстояние, мм
Сухая	8×	0,20	18,2	8,53
Сухая	40×	0,65	4,3	0,40
Масляная иммерсия	90×	1,25	1,9	0,10

Микроскопы имеют сухие объективы для наблюдения живых микроорганизмов, а также для поиска нужного поля зрения, дающие увеличение в 8 (10) и 40 раз, и иммерсионные, увеличивающие объект в 90 (100 раз) и позволяющие провести более детальное изучение формы и строения микроорганизмов.

У сухих между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух, у иммерсионных заполнено маслом (кедровым, касторовым, гвоздичным и др.) или водой. Стекло, на котором изготовлен препарат, стекло объективов и масло (кедровое) имеют почти одинаковый показатель преломления света (1,52 и 1,515). Лучи, проходя из одной среды в другую, почти не преломляются, свет не рассеивается, рассматриваемые объекты не искажаются и при этом бывают хорошо видны. Воздух и стекло имеют разный показатель преломления света (1,0 и 1,52), в результате чего лучи света при переходе из одной среды в другую преломляются, рассеиваются, происходит частичное искажение рассматриваемых объектов.

Окуляр содержит две линзы - глазную (верхнюю) и собирающую и служит для рассмотрения изображения предмета, даваемого объективом, т. е. выполняют роль линзы. Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе, например, 15×. Общее увеличение окуляра повышается с уменьшением фокусного расстояния линз, его составляющих, поэтому более сильные окуляры будут короткими, а более слабые - длинными.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, например, использование окуляра 15× и объектива 90× позволяет увеличить объект в 1350 раз. Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким.

Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, которая зависит от длины волны используемого света и числовой апертуры оптической системы микроскопа. Разрешающая способность связана обратной связью с пределом разрешения - минимальным расстоянием между двумя точками, при котором еще можно различить каждую из них.

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. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот и щелочей. 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.

Установка света по Келеру

- Поднять тубус с помощью макрометрического винта вверх.
- Установить объектив 8×.
- Поднять конденсор вверх до упора.
- Открыть полностью диафрагму конденсора и отодвинуть матовое стекло, расположенное под конденсором.
- Поставить плоское зеркало.
- Включить осветитель и поймать с помощью плоского зеркала зайчик, глядя в окуляр.
- Глядя на световое пятно на листе бумаги, расположенного на предметном столике, добиться изображения четких краев светового пятна, поднимая или опуская конденсор.
- Приступить к микроскопированию.

По окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином или бензолом. Оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксации пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа. Эффективен способ удаления масла, как жидкого, так и застывшего, свежееотломленным пенопластом. В отдельных случаях помогает протирка тканью, смоченной дистиллированной водой. Края линз с выступающей оправой очищают с помощью палочки, обернутой тканью.

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

а) ставят объектив с малым увеличением (×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;

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

в) опускают объектив (×8) при помощи макрометрического винта почти до соприкосновения с предметным стеклом, на расстояние около 0,5 см от предметного столика;

г) медленно вращают макровинт против часовой стрелки до появления четкого изображения препарата, после чего наводят резкость микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота макровинта;

д) повернув револьвер, устанавливают объектив со средним увеличением (×20; ×40; ×60);

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

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

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

б) установить зеркало плоской стороной и поднять конденсор;

в) повернуть револьвер до отметки иммерсионного объектива ×90;

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

д) установить ориентировочный фокус при помощи макрометрического винта;

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

ж) по окончании работы микроскопа необходимо специальной салфеткой тщательно вытереть масло с иммерсионного объектива и перевести револьвер на малый сухой объектив ×8.

2. Микроскопия в темном поле

Микроскопия в темном поле основана на освещении объекта косыми лучами света. Эти лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если препарат содержит клетки микроорганизмов, то косые лучи, проходя через такой препарат, в значительной степени отражаются от поверхности клеток и настолько уклоняются от своего первоначального направления, что попадают в объектив. Тогда наблюдатель видит на черном фоне интенсивно светящиеся объекты, даже если их диаметр в 10 раз меньше, чем предел разрешения объектива. Такое освещение препарата достигается применением специального конденсора. Темнопольный конденсор имеет затемненную среднюю часть, поэтому центральные лучи света, идущие от зеркала, задерживаются, а в плоскость препарата попадают только боковые лучи, отраженные от зеркальных поверхностей, расположенных внутри конденсора.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, т.е. лежит за пределами видимости обычного микроскопа. Однако наблюдение объектов в темном поле позволяет различить только их контуры, но не дает возможности рассмотреть внутреннее строение.

Метод используется с целью исследования живых клеток микроорганизмов. Особенно он ценен для функционально-морфологического изучения крупных объектов типа дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов 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.

3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством

Микроскопия с фазово-контрастным устройством основана на том, что с его помощью различия в фазе световых лучей, возникающие при прохождении их через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, в результате чего объекты становятся контрастными. Глаз человека выявляет различия в длине волны света (цвет) и ее амплитуде (интенсивность, яркость), но не в состоянии заметить смещение фазы. Неокрашенные клетки микроорганизмов хорошо видны в проходящем свете обычного светлопольного микроскопа

только в том случае, когда значительная часть энергии света, прошедшего через них, поглощается. При этом выходящая из объекта (клетки) световая волна имеет меньшую амплитуду, т.е. яркость, и этот объект воспринимается глазом наблюдателя как более темный, контрастный по сравнению с окружающей средой. Однако многие микроорганизмы, размеры которых лежат в пределах разрешающей способности микроскопа, мало отличаются по прозрачности (плотности) от окружающей среды. Амплитуда световой волны, проходящей через клетки таких микроорганизмов, почти не меняется, поэтому объекты плохо различимы или даже невидимы в обычный светлопольный микроскоп. Поле зрения кажется наблюдателю почти однородным.

Объект можно сделать более контрастным, либо почти до предела закрывая диафрагму конденсора, либо окрашивая клетки, либо применяя фазово-контрастное устройство. Первое нежелательно, так как снижает апертуру конденсора и тем самым заметно уменьшает разрешающую способность микроскопа. Окрашивание препарата дает хорошие результаты, но в большинстве случаев оно осуществляется после фиксации микроорганизмов, что не всегда желательно. Основная ценность метода фазового контраста состоит в том, что он дает возможность наблюдать живые объекты, не прибегая к их фиксации и окрашиванию. Применение фазово-контрастного устройства не позволяет увеличить разрешающую способность микроскопа, но дает возможность увидеть прозрачные объекты более четко и даже выявить некоторые структуры и включения в клетках крупных бактерий.

Оптическая система, используемая для получения фазового контраста, состоит из фазовой пластинки и кольцевой диафрагмы. Фазовая пластинка расположена в задней фокальной плоскости объектива и представляет собой прозрачный диск, на котором напылено кольцо из металлов. Кольцевая диафрагма расположена под конденсором и представляет собой прозрачную щель в виде кольца на непроницаемой для света пластинке.

4. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности многих веществ биологического происхождения (хлорофилл, витамин В₂, некоторые алкалоиды и антибиотики и т.д.) и красителей светиться под

воздействием падающего на них света. Молекулы веществ, способных к люминесценции, поглощают энергию падающего света и переходят в возбужденное состояние, которое характеризуется более высоким энергетическим уровнем. В таком состоянии они находятся непродолжительное время и вновь возвращаются к исходному энергетическому уровню. Этот переход сопровождается отдачей избытка энергии в виде света - люминесценцией. Как правило, для возбуждения люминесценции объект освещают ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 300 - 400 нм или сине-фиолетовыми лучами с длиной волны 400 - 460 нм.

Клетки большинства микроорганизмов люминесцируют очень слабо, поэтому их обрабатывают специальными красителями - флуорохромами, обладающими люминесценцией. Люминесценцию объекта после обработки флуорохромами называют наведенной, или вторичной.

Люминесцентная микроскопия увеличивает контрастность изображения, дает возможность различить отдельные клеточные структуры и даже отметить их изменения при различных функциональных состояниях клетки. Этот вид микроскопии широко применяют для цитологических исследований, выявления живых и мертвых клеток, для изучения микроорганизмов в почвах, илах и ризосфере растений.

5. Электронная микроскопия

В отличие от световых микроскопов электронные обслуживаются специалистами по их эксплуатации. Предел разрешения электронного микроскопа на три порядка выше, чем светового, и достигает 0,1 нм. В практике биологических исследований достигается разрешение 0,5 - 1,0 нм. Получаемое при этом увеличение составляет 5000 - 50000 крат (на экране микроскопа и фотопленке) и может быть повышено еще в 5 - 10 раз при фотопечати.

Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов.

Электронный микроскоп в отличие от светового позволяет исследовать только неживые высушенные объекты, так как образец находится в условиях высокого вакуума и интенсивного электронного облучения. Принцип возникновения изображения в электронном микроскопе иной, чем в световом. Известно, в световом микроскопе

контраст обусловлен избирательным поглощением света различных длин волн элементами структуры объекта (адсорбционный контраст) или изменением фазы световой волны, при прохождении света через объект (фазовый контраст), тогда как в электронном микроскопе контраст вызван отклонением ускоренных электронов тяжелыми атомами, входящими в состав тонкопленочного объекта (или искусственно внесенными в него при «химическом» контрастировании). Такой контраст называют дифракционным.

Основной частью электронного микроскопа является вакуумная колонна, в которой последовательно расположены по принципу осевой симметрии электронная пушка, содержащая катод и анод, а также ряд магнитных линз и люминесцирующий экран. Электронная пушка обеспечивает эмиссию и ускорение электронов. Часть электронов проходит через отверстие в центре анода (центральную апертуру) и образует электронный луч, который фокусируется первой магнитной линзой (конденсорной) и освещает объект. Прошедшие через объект электроны фокусируются второй магнитной линзой (объективной), формирующей увеличенное изображение объекта, которое затем дополнительно увеличивается третьей магнитной линзой (проекционной) и проецируется на люминесцирующий экран или фотопленку.

На сегодняшний день электронные микроскопы бывают трех видов: трансмиссионные (просвечивающие), сканирующие и электронные микроскопы высокого напряжения.

Электронный микроскоп, создающий изображение благодаря прохождению (просвечиванию) электронов сквозь тонкопленочный образец, называется просвечивающим или трансмиссионным (ТЭМ). Он позволяет выявить детали внутреннего строения микроорганизмов, а также особенности их взаимодействия в анализируемом образце. Предварительно образец фиксируют химически, заливают в различные смолы и контрастируют солями тяжелых металлов. Микроорганизмы и вирусы можно наблюдать в ТЭМ и без заливки в смолы. Для этого каплю суспензии помещают на пленку-подложку, высушивают и контрастируют химически или физически - косым напылением металлов (оттенение).

В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) или в просвечивающем электронном микроскопе со сканирующей приставкой изображение на телевизионном экране получается вследствие того, что первичный электронный луч, сканируя поверхность образца, взаимо-

действует с электронными оболочками атомов вещества объекта, что вызывает различные вторичные излучения. Их относительная интенсивность зависит от характеристик облучаемой поверхности рельефа, химического состава и электропроводности. Различия в интенсивности вторичных излучений преобразуются в изменение амплитуды электрических сигналов, что регистрируется на экране или фотопленке. Достижимое при этом полезное увеличение меньше, чем в ТЭМ, и, как правило, не превышает 50 000 крат (разрешение порядка 3 - 5 нм). Сканирующая электронная микроскопия позволяет получить трехмерное (стереоскопическое) изображение и наиболее эффективна для выявления поверхностных структур микроорганизмов, определения формы. Предварительно образец фиксируют химически, высушивают специальными методами и напыляют в вакууме золотом, платиной или палладием для повышения интенсивности вторичноэлектронной эмиссии и создания на поверхности электропроводящего покрытия, снимающего поверхностный заряд.

Контрольные вопросы

1. Какие конструктивные элементы включает механическая часть микроскопа?
2. Что относится к оптической части микроскопа?
3. Как определяется общее увеличение микроскопа?
4. Что такое разрешающая способность микроскопа?
5. Какие правила необходимо соблюдать при работе с микроскопом и уходе за ним?
6. В чем заключается разница при работе с иммерсионным и сухим объективами микроскопа?
7. Какие виды световой микроскопии Вы знаете?
8. Назовите основные виды электронных микроскопов.
9. Перечислите преимущества и недостатки световой и электронной микроскопии.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №3

Тема. Изучение микроорганизмов в светлопольном микроскопе

План

1. Препараты живых клеток микроорганизмов. Негативный способ окраски
 2. Приготовление фиксированных препаратов. Простая окраска клеток
 3. Определение размеров микробных клеток
- Контрольные вопросы

Морфологические особенности клеток микроорганизмов можно изучать, используя различные методы микроскопии, а также применяя некоторые способы дифференциальной окраски. Выбор методов микроскопического анализа и способов окраски определяется конкретной целью исследования. Однако существует ряд приемов, которые имеют принципиальное значение и лежат в основе большинства специальных методов исследования морфологии и цитологии бактерий. Это некоторые способы приготовления препаратов, фиксации и окраски клеток.

Большинство клеток микроорганизмов в естественных условиях не окрашены и поэтому плохо видны в световой микроскоп, с трудом поддаются изучению. В связи с этим Р. Кох первым стал пробовать окрашивать микроорганизмы для их изучения.

Изучение строения микробных клеток на уровне светового микроскопа возможно при использовании цито- и гистохимических методов окраски. Используют, как правило, анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Наибольшее применение имеют основные красители (красящая группировка - хромофор - катион): красные (сафранин, фуксин основной, гематоксилин); фиолетовые (генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый и т.д.); синие (метиленовый синий, виктория); коричневые (кризоилин, незурин); зеленые (янус зеленый) и черные (индулин).

Реже применяют нейтральные красители (нейтральный красный) и кислые красители (эозин).

К кислым красителям относятся красные (фуксин кислый, эритрозин), желтые (конго, пикриновая кислота), черные (нигрозин).

Из названных красителей готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы.

В настоящее время можно выделить следующие виды окраски:

– Окраска прижизненная (витальная). Для нее используют только витальные красители, не вызывающие гибель клеток. Таковыми являются, например, водные растворы в концентрации 0,2–0,001 % метиленового синего, конго красного.

– Окраска фиксированных препаратов. В отличие от «живых» препаратов, фиксированные нет смысла изучать без окраски. Фиксация включает в себя и «убийство» клеток, поэтому возможности для применения различных окрасок не ограничены.

Живые микроорганизмы прокрашиваются значительно труднее, чем те же микроорганизмы, фиксированные различными способами. Окрашивание происходит лишь только после того, как нарушается проницаемость стенки и цитоплазматической мембраны.

Также для рассмотрения фиксированных препаратов можно использовать иммерсию и иммерсионный объектив. Кроме этого, окраску подразделяют на следующие виды:

– *Простая*, проходящая в одну стадию с использованием одного красителя; в качестве красителей обычно используют метиленовый синий, водный раствор фуксина, водный раствор сафранина.

– *Сложная*, когда окраска производится минимум двумя красителями с этапом отмывки между ними. Классический пример сложной окраски – окраска по Граму, другой пример, использующийся в медицинской практике, – окраска по Цилю – Нельсону.

– *Дифференцированная*, при которой прокрашиваются определенные части микроорганизмов – капсула, нуклеоид, включения, жгутики и т. д.

Различают:

- *позитивное окрашивание* – непосредственная окраска клетки или отдельных структур, органоидов, включений;

- *негативное окрашивание* – окраска пространства вокруг клетки, в результате чего клетка выглядит силуэтом на фоне красителя.

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2 - 1,4 мм. Применение более толстых стекол не позволяет получить резкое изображение краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата, так как оно попадает в толщу стекла, что нарушает фокусировку конденсора

и резко снижает четкость изображения. Чрезмерная толщина предметного стекла недопустима при работе с иммерсионным объективом, когда необходимо полностью использовать числовую апертуру системы.

Существенным моментом является подготовка поверхности предметных стекол, что особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в выпуклые, медленно высыхающие капельки. Наиболее надежный способ обезжиривания - обработка стекол хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой и спиртом. В повседневной работе, однако, вполне достаточно бывает тщательно натереть сухое стекло мылом, после чего вытереть его чистой хлопчатобумажной салфеткой. Хорошее обезжиривание достигается протиранием вымытых и высушенных стекол ватой, смоченной эфиром (после этого промывание водой не требуется), или обжиганием поверхности стекол в пламени горелки (жир при этом сгорает). *Кипячение стекол в растворах щелочей не рекомендуется, так как щелочи разъедают стекло и поверхность его становится матовой.* Хранить чистые обезжиренные стекла можно в сухом состоянии или в этаноле.

Покровные стекла, применяемые для приготовления препаратов микроорганизмов, также должны быть тщательно вымыты и высушены. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15 - 0,17 мм. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

Клетка прокариотических организмов имеет сложное строго упорядоченное строение и обладает принципиальными особенностями ультраструктурной организации и химического состава (рис.18).

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные.

Основными структурами являются: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид; временные – капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерий, у некоторых видов они отсутствуют полностью.

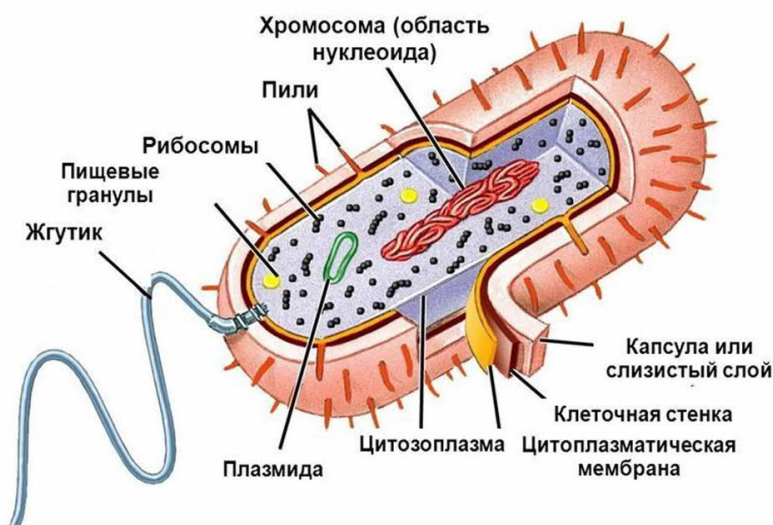


Рис. 18. Строение клеток микроорганизмов

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки).

Термин «оболочка» в настоящее время используется для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки, цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

Клеточная стенка – важный структурный элемент бактериальной клетки, располагающийся между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий это внешняя оболочка клетки. Она обязательна для всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме. Толщина клеточной стенки 10-100 нм, и на ее долю приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является пептидогликан, или муреин (лат. *murus* – стенка), опорный полимер, имеющий сетчатую структуру и образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки.

Капсула – слизистый слой, расположенный над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. Капсула не является обязательной структурой бактериальной клетки. Она обеспечивает выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, заражения фагами.

Жгутики – органоиды движения бактерий, представленные тонкими, длинными, нитевидными структурами белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10 - 20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80 - 90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) – полный спиральный цилиндр диаметром 12 - 20 нм. У вибрионов и протей нить окружена футляром толщиной 35 нм.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий: монотрихи - бактерии с одним полярно расположенным жгутиком; амфитрихи - бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах; лофотрихи - бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки; перитрихи - бактерии с множеством жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей ее поверхности. Бактерии, не имеющие жгутиков, называют атрихиями.

Пили (фимбрии, ворсинки) – прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3 - 25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют фимбриями. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. Половые пили возникают на поверхности бактерий в процессе конъюгации и выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) и ее производные. Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) - полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8 - 15 % ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. Цитоплазматическая мембрана в химическом

отношении - белково-липидный комплекс, состоящий из 50 - 75 % белков и 15 - 50 % липидов. Основная часть мембранных липидов (70 - 90 %) представлена фосфолипидами. Она построена из двух мономолекулярных белковых слоев, между которыми расположен липидный слой, состоящий из двух рядов правильно ориентированных молекул липидов.

ЦПМ служит осмотическим барьером клетки, контролирует поступление питательных веществ в клетку и выход продуктов метаболизма наружу.

Цитоплазма - содержимое бактериальной клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Состоит из цитозоля - гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты РНК, вещества субстрата, ферменты, продукты метаболизма, и структурных элементов - рибосом, внутрицитоплазматических мембран, включений и нуклеоида.

Рибосомы - органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями. Бактериальные рибосомы - гранулы диаметром 15 - 20 нм, имеют константу седиментации 70S и образованы из двух рибонуклеопротеидных субъединиц: 30S и 50S*. Одна бактериальная клетка может содержать от 5000 - 50 000 рибосом (*30S, 50S, 70S - константы седиментации, характеризующие скорость, с которой эти частицы осаждаются в центрифуге при определенных стандартных условиях), посредством иРНК они объединяются в полисомы-агрегаты, состоящие из 50 - 55 рибосом, обладающих высокой белоксинтезирующей активностью.

Нуклеоид - ядро у прокариот. Он состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1 - 1,6 нм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или генофор.

Нуклеоид у прокариот не ограничен от остальной части клетки мембраной - у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки и отсутствуют гистоны; хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий - на мезосоме. Бактериальная хромосома реплицируется поликонсервативным способом: родительская двойная спираль ДНК раскручивается и на матрице каждой полинуклеотидной цепи собирается новая комплементарная цепочка. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и

расхождение дочерних ядер обеспечивается ростом цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро - дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. Это связано с тем, что деление бактериальной клетки во времени осуществляется после завершения цикла репликации молекулы ДНК и оформления дочерних хромосом.

В нуклеоиде сосредоточен основной объем генетической информации бактериальной клетки.

Кроме нуклеоида в клетках многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы - плазмиды, представленные небольшими кольцевыми молекулами ДНК, способными к автономной репликации.

1. Препараты живых клеток микроорганизмов. Негативный способ окраски

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде переносят в каплю воды бактериологической петлей, выращенные в жидкой среде, - стерильной пипеткой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой. Нельзя допускать образования пузырьков воздуха под покровным стеклом. Этот вид препарата позволяет установить форму клеток, их размер, способ спорообразования, наличие или отсутствие подвижности.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей или обычным пером наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение

за объектом. Для длительных наблюдений используют стерильные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят в жидкой питательной среде. Препарат «*висячая капля*» используют для выявления подвижности у микроорганизмов, изучения способов размножения, наблюдения за прорастанием спор.

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего (1:40) на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом.

Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Препарат «микрокультура» или «агаровая пленка». На тонкое, простерилизованное и нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,2 - 0,3 мл горячей агаризованной питательной среды и распределяют по всей поверхности стекла. После застывания среды петлей удаляют лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов бактериальной петлей или пипеткой наносят каплю жидкой культуры или суспензии клеток микроорганизма. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку с выросшей микрокультурой наносят каплю красителя или каплю воды в случае подсыхания пленки и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Метод, основанный на получении роста микроорганизма непосредственно на предметном стекле, позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами роста и развития, влиянием токсических и других агентов на эти процессы. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей колонии. Рост можно осуществлять в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом) условиях.

Агаровую пленку можно нанести на покровное стекло и приготовить препарат «висячая капля». На таком препарате можно наблюдать движение бактерий по типу скольжения.

Негативный способ окраски

Для негативного окрашивания чаще всего пользуются жидкой тушью или конго красным. Окрашивание негативными красителями можно вести двумя путями: либо раствор наносят на сухой мазок, дают ему высохнуть и сухой препарат рассматривают с иммерсией, либо каплю исследуемой суспензии бактерий смешивают с красителем непосредственно на предметном стекле, покрывают ее покровным стеклом и изучают с сухой системой.

Выявление живых и мертвых клеток грибов. Метод выявления живых и мертвых клеток дрожжей и грибов основан на различной проницаемости красителя в клетки, характеризующейся различным физиологическим составом. Выявление живых и мертвых клеток грибов проводят на витальных (прижизненных препаратах) с помощью метиленового синего. Для этого на предметное стекло в каплю микробной суспензии вносят каплю красителя метиленового синего, выдерживают не более одной минуты, накрывают покровным стеклом, оттягивают избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют в проходящем свете. Живые клетки, не пропускающие краситель, не окрашены, мертвые клетки синего цвета.

2. Приготовление фиксированных препаратов. Простая окраска клеток

Микроорганизмы в лабораторных условиях выращивают обычно в пробирках, колбах, чашках Петри в жидких и на плотных питательных средах. При пересевах культур или при извлечении части клеток для приготовления препарата необходимо строго соблюдать условия, которые позволили бы предохранить культуру от загрязнения другими микроорганизмами.

В процессе приготовления фиксированного препарата можно выделить следующие этапы:

1. Приготовление мазка
2. Высушивание мазка
3. Фиксация препарата
4. Окраска препарата.

Приготовление мазка. Пробирку с чистой культурой берут в левую руку таким образом, чтобы была хорошо видна поверхность питательной среды с выросшей на ней культурой. В правую руку берут бактериологическую петлю так, как держат карандаш, и прокалывают ее в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони и держат так во время последующих манипуляций. Края открытой пробки обжигают в пламени горелки, вводят в нее петлю и берут небольшое количество микробной массы. Горлышко пробирки снова обжигают, слегка обжигают пробку и закрывают ею пробирку, а микробную массу переносят в каплю воды на обезжиренном предметном стекле. Не следует вносить много культуры, капля должна стать слегка мутной. Остаток микробной массы на петле сразу же сжигают в пламени горелки. Из капли с внесенной культурой готовят мазок, равномерно размазывая ее петлей или краем покровного стекла на площади 2-4 см².

Высушивание мазка. Мазок просушивают на воздухе или, слегка нагревая в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Нельзя перегревать мазок: клетки микроорганизмов могут деформироваться! Хороший мазок после сушки должен давать на предметном стекле еле заметный налет.

Фиксация препарата. После высушивания приступают к фиксации препарата. Фиксация имеет целью:

- 1) убить микроорганизмы,
- 2) обеспечить их лучшее прилипание к стеклу и тем самым предохранить препарат от смывания,
- 3) сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки лучше красятся, чем живые.

Для фиксации чаще всего используется высокая температура. С этой целью захватывают предметное стекло мазком вверх пинцетом и 3 раза проводят через пламя горелки. Перед окраской препарат охлаждают!

Для исследования тонкого строения клетки применяют фиксацию различными химическими веществами. Фиксирующую жидкость наносят на мазок, или препарат погружают в фиксатор. При фиксации этиловым спиртом время фиксации 15-20 мин., метиловым спиртом – 3-5 мин., ацетоном – 5 мин. По окончании фиксации препарат осторожно промывают водопроводной водой.

Окраска препарата. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают:

- кислые,
- основные красители.

К кислым красителям относятся те, у которых ион, придающий окраску (хромофор), анион. У основных красителей хромофором является катион. Примером кислых красителей служит эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин – интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерий делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно *основные красители*.

Различают:

- простые,
- дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов.

При простой окраске прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальная окраска предполагает окрашивание не всей клетки, а определенных ее структур. С помощью дифференциальной окраски выявляют некоторые клеточные структуры и запасные вещества.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются метиленовым синим, фуксином, генциановым фиолетовым. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие над кюветой, и заливают красителем на 1-3 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал. В случае необходимости на мазок наливают новые порции красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом 90×. Для получения более чистых препаратов краситель наливают на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать

вместо растворов красителей фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем.

В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки микроорганизмов. Фиксировать и окрашивать можно также и препараты «отпечатки». Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

3. Определение размеров микробных клеток

Размеры микробных клеток варьируют в широких пределах: от сотых долей микрометров (мкм) у некоторых бактерий до нескольких десятков и сотен микрометров у микроскопических простейших и водорослей.

Определение размеров клеток микроорганизмов под микроскопом включает три этапа: определение размеров клеток в делениях окулярной линейки, определение цены деления окулярной линейки в мкм и расчет размеров клеток в мкм.

1. Определение размеров клеток в делениях окулярной линейки осуществляют с помощью окулярной линейки (окуляр-микрометра), которую помещают на диафрагму окуляра, для чего вывинчивают глазную линзу окуляра, устанавливают окуляр-микрометр и вновь завинчивают линзу (рис.19).

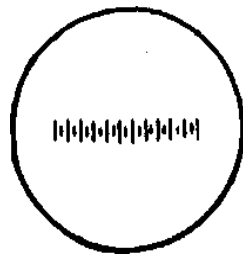


Рис. 19. Окулярный микрометр

На столик микроскопа помещают препарат «раздавленная капля», препарат парафинируют для предохранения от высыхания нанесением расплавленного парафина на края покровного стекла. Фикси-

рованные препараты для определения размеров клеток нежелательны, так как фиксация и окраска может изменить размеры клеток. Если клетки подвижны, препарат слегка подогревают или к капле исследуемой суспензии добавляют 0,1% водный раствор агар-агара.

После установки препарата на столике микроскопа, проводят фокусировку объекта. Путем передвижения предметного столика в двух плоскостях располагают клетки на шкале окуляр-микрометра и определяют, скольким делениям линейки соответствует длина и ширина клетки при данном увеличении микроскопа. Чтобы результаты были достоверными, измеряют обычно не менее 10-20 клеток. У кокков измеряют диаметр, у других форм - длину и ширину.

2. Определение цены деления окулярной линейки в мкм проводят с помощью объективной линейки (объект-микрометра) для данного увеличения микроскопа.

3. Объективный микрометр представляет собой металлическую пластинку с отверстием в центре, в которое вставлено стекло. На стекло нанесена линейка длиной 1 мм, которая разделена на 100 частей, так что одно деление ее соответствует 0,01 мм или 10 мкм (рис. 20).

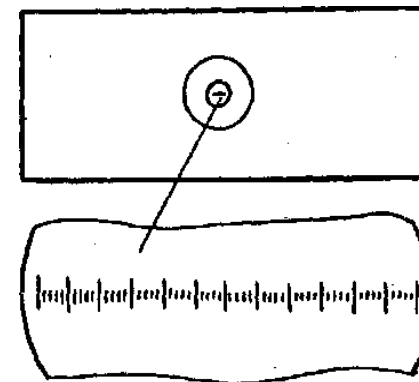


Рис. 20. Объективный микрометр

Для определения цены деления окулярной линейки на столик микроскопа вместо препарата помещают объективный микрометр и при малом увеличении фокусируют изображение линейки. Затем перемещают линейку объект-микрометра в центр поля зрения и меняют объектив на тот, при котором измеряли размер клеток. Перемещая

столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую (рис.21).

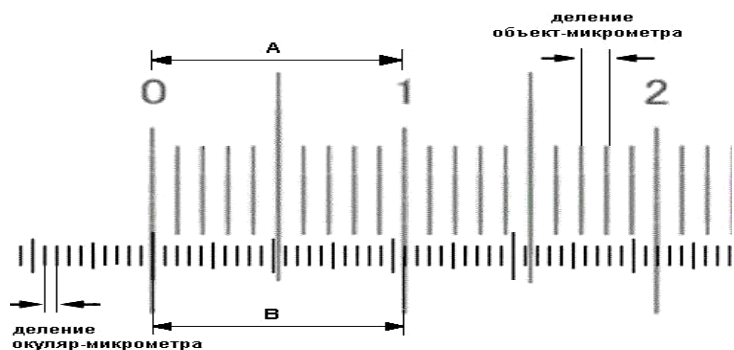


Рис. 21. Определение цены деления

Совмещают одно из делений шкалы окулярного и объективного микрометров и находят следующее их совмещение. Устанавливают, какую часть деления объективного микрометра составляет одно деление окулярной линейки и умножают полученное число на 10. Таким образом, получают цену деления окулярного микрометра в микрометрах для данного увеличения микроскопа:

$$a = n \cdot 10 \text{ мкм} / n_1,$$

где a - цена деления окуляр-микрометра, мкм;

n - число делений объект-микрометра;

n_1 - число делений окуляр-микрометра;

10 мкм – цена одного деления объект-микрометра.

Определение цены деления окуляр-микрометра проводят в трехкратной повторности, каждый раз сбивая совмещения и устанавливая новые. Результаты определений записывают в таблицу.

Таблица 4

Результаты определений

Объектив	Окуляр	Цена деления (каждого из трех определений), мкм			Цена деления (среднее значение), мкм
		a_1	a_2	a_3	
10 ^x	7 ^x	a_1	a_2	a_3	a_{cp}
40 ^x	10 ^x	a_1	a_2	a_3	a_{cp}
90 ^x	15 ^x	a_1	a_2	a_3	a_{cp}

3. Расчет размеров клеток в мкм. Зная, скольким делениям окулярной линейки соответствует длина и ширина изучаемого объекта, умножают цену деления окуляр-микрометра на эти числа:

$$N = N_1 \cdot a,$$

где N - длина или ширина клетки, мкм;

N_1 - число делений окуляр-микрометра;

a - цена деления окуляр-микрометра.

Размеры клеток микроорганизмов в конечном счете записывают по форме:

$$(N - N_1) (n - n_1) \text{ мкм},$$

где N и N_1 - минимальное и максимальное значения длины клетки;

n и n_1 - минимальное и максимальное значение ширины клетки;

мкм - единица измерения размеров клеток.

Например: (2-3)*(0,1-1,0).

Результаты определения размеров клеток микроорганизмов вносят в таблицу.

Таблица 5

Результаты определения размеров клеток

Культура микроорганизма	Число измеряемых клеток	Длина		Ширина		Размер клеток, записанный по форме $(N - N_1) (n - n_1)$
		в делениях окулярной линейки	в мкм	в делениях окулярной линейки	в мкм	

Контрольные вопросы

1. Какие способы обработки и хранения предметных и покровных стекол вам известны?
2. Объясните цели приготовления прижизненных препаратов: «раздавленная капля», «висячая капля».
3. Как правильно приготовить препарат «висячая капля».
4. Перечислите этапы приготовления препаратов фиксированных клеток.
5. Перечислите основные цели фиксации препарата.
6. В чем заключается различие простого и дифференциального способа окрашивания клеток микроорганизмов?
7. Какие красители используют в микробиологической практике?

8. Какие приборы используются для измерения размеров микробных клеток?

9. Перечислите основные этапы определения размеров клеток микроорганизмов.

10. В каких единицах длины измеряют размеры клеток бактерий?

11. Назначение окулярной линейки.

12. Каким образом готовят препарат для определения размеров клеток?

13. Назначение объективной линейки.

14. Методика определения цены деления окулярной линейки.

15. Расчет размера клеток микроорганизмов по показаниям микрометра.

16. Конечная форма записи размеров микробных клеток.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №2

Тема. Специальные методы окраски микроорганизмов

План

1. Окраска клеток по Граму
 2. Окраска спор
 3. Методы обнаружения капсул
 4. Окраска внутриспоровых включений
- Контрольные вопросы

1. Окраска клеток по Граму

Для дифференциации микробных клеток, различающихся химическим составом и структурой клеточных стенок, используется сложный метод окраски - окраска по Граму (по имени датского ученого).

При окраске по Граму все бактерии делятся на две группы:

- грамположительные,
- грамотрицательные.

У *грамположительных бактерий* (G⁺) толщина клеточной стенки составляет 15-80 нм, состоит из пептидогликана (от 60-90%), расположенных в несколько слоев белка (около 1%) и липидов (около 1%). Обнаружены полимеры особого типа - тейхоевые кислоты, ковалентно связанные с пептидогликаном. Большое содержание пептидогликана обеспечивает при окраске по Граму образование комплекса с генциановым фиолетовым и йодом, устойчивого к спирту, вследствие чего они окрашены в сине-фиолетовый цвет.

Толщина клеточной стенки грамотрицательных бактерий 10-15 нм, но структура ее значительно сложнее, чем у грамположительных бактерий. Основу ее составляют ориентированные внутренние липиды (10-20%), которые с поверхностно расположенными полисахаридами образуют липополисахаридный слой. На поверхности клеточной стенки мозаично расположены белки и полисахариды. Пептидогликан представлен одним слоем толщиной всего 2-3 нм (около 5-10%), лежит под липополисахаридным слоем и плотно покрывает протопласт. Из-за большого содержания липидов клеточная стенка грамотрицательных бактерий при окраске по Граму образует с генциановым фиолетовым и йодом комплекс, разрушаемый при обработке спиртом, вследствие чего клетки обесцвечиваются.

Неодинаковое отношение микроорганизмов к окраске по Граму связано с различиями в структуре и химическом составе клеточной стенки бактерий.

К грамположительным микроорганизмам относятся кокки, бациллы (спорообразующие палочки), актиномицеты, микобактерии, кластридиальные бактерии, дрожжи (рис.22).

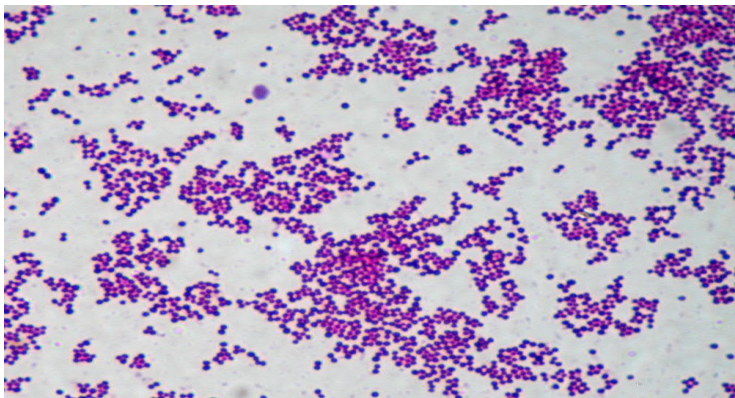


Рис. 22. Грамположительные бактерии

К грамотрицательным микроорганизмам относятся: бактерии (неспорообразующие палочки), спираиллы, сальмонеллы, *Escherichia coli* (кишечная палочка), псевдомонады, азотбактер, вибрионы (рис.23).



Рис. 23. Грамотрицательные бактерии

Имеются грамвариабельные микроорганизмы, отношение которых к окраске по Граму меняется на определенных этапах их жизненного цикла. Так как способность клеток окрашиваться по Граму зависит от их возраста, для окраски по Граму используют клетки молодой культуры, чаще всего односуточной. Для сравнения одновременно с определяемым объектом целесообразно окрашивать клетки микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму известно (контроль).

Окраску по Граму осуществляют следующим образом:

1. Готовят на предметном стекле три мазка культуры микроорганизмов: в центре - мазок исследуемой культуры, слева и справа - мазки контрольных микроорганизмов (рис.24).

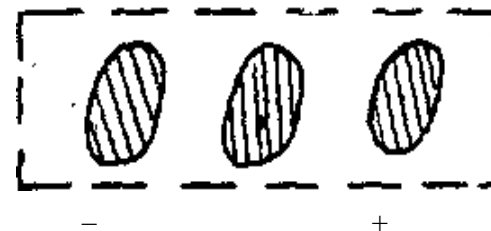


Рис. 24. Расположение мазков на предметном стекле при окраске по Граму

Мазки должны быть тонкими, чтобы клетки равномерно были распределены по поверхности стекла и не образовывали скоплений, так как от толщины мазка могут зависеть результаты окрашивания.

Высушивают мазки на воздухе, фиксируют над пламенем горелки.

2. Окрашивают мазки карболовым генциановым фиолетовым. На мазки наносят достаточное количество красителя, выдерживают 1-2 мин, краситель сливают и, не смывая водой, мазки обрабатывают раствором Люголя до почернения (приблизительно 1-2 мин.).

3. Сливают раствор Люголя и обрабатывают препарат 0,5-1 мин. (строго!!!) 96% этиловым спиртом или путем погружения в стаканчик со спиртом, или путем нанесения спирта на мазки (от времени обработки мазка спиртом зависит результат всего окрашивания: при недостаточной обработке все бактерии сохраняют окрашивание, при чрезмерной - обесцвечиваются).

4. Препарат немедленно промывают водой и окрашивают его 1-2 мин. водным фуксином. Сливают краситель, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой.

5. Микроскопируют препарат с иммерсионной системой.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный или розовый цвет фуксина (цвет дополнительного красителя) (рис.25).

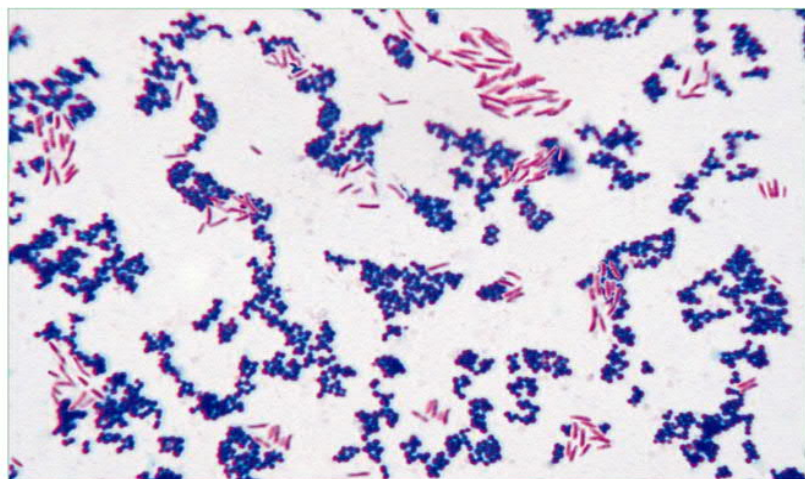


Рис. 25. Смешанная культура представителей грамположительной и грамотрицательной микрофлоры

2. Окраска спор

К сложным (специальным) методам относят методы окраски спор.

При неблагоприятных условиях для роста, при лимитировании роста питательными веществами некоторые бактерии образуют покоящиеся клетки особого рода - споры (эндоспоры).

К образованию эндоспор способна только небольшая группа бактерий, это в основном палочковидные грамположительные бактерии (р. *Bacillus*, р. *Clostridium*, р. *Desulfotomaculum*). Споры не являются обязательной стадией жизненного цикла этих бактерий. Спорообразование (споруляция) – один из сложнейших процессов дифференцировки бактериальной клетки и сопровождается сложными метаболическими процессами. При автолизе материнской клетки споры освобождаются. Зрелые споры не проявляют никакой

метаболической активности, но в течение многих лет сохраняют потенциальную способность к прорастанию и развитию в вегетальные клетки. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, что обусловлено низким содержанием воды (около 15%), а также к разного рода излучений и химических веществ, что, с одной стороны, определяет их повсеместное распространение в различных природных средах, а с другой стороны, затрудняет борьбу со спорообразующими патогенными бактериями.

При микроскопическом исследовании споры видны благодаря своему высокому показателю преломления, характерному для обезвоженного белка, поэтому их легко отличить от вегетативных клеток при просмотре в микроскоп. Споры различных бактерий отличаются по форме, размеру и расположению в клетке. При светлопольной микроскопии споры выявляются в виде темных включений. При наблюдении с фазово-контрастным устройством споры имеют вид светлых включений на фоне темных клеток.

Споры бацилл (рис. 26) обладают высокой устойчивостью к высушиванию, нагреванию, к обработке кислот и щелочей, что объясняется особым строением и химическим составом споры, в особенности ее оболочки. Поэтому споры стойки и к действию красителей.

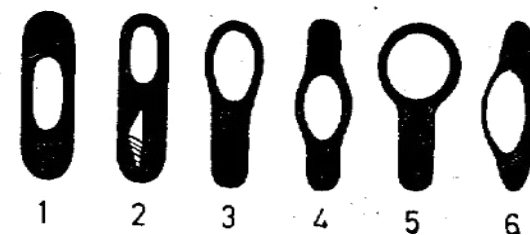


Рис. 26. Типичные формы спорообразующих клеток
1, 2 - бациллы; 3-6 клостридии; 3- спора расположена субтерминально (форма булавы); 4 - спора расположена в центре (форма веретена - клостридиальная); 5 - спора расположена терминально (форма барабанной палочки); 6 - спора расположена латерально, веретенообразная форма.

Более надежный способ обнаружения спор заключается в дифференциальной окраске клеток и спор, основанной на их различной способности окрашиваться красителем и удерживать его при обработке водой или кислотой.

Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Поэтому применяют протраву (хромовая кислота разрыхляет оболочку), а подогревание делает ее еще более проницаемой для горячего фуксина с протравителем фенолом. После охлаждения оболочка вновь становится плотной, не пропускает серную кислоту и дополнительный краситель.

Метод Меллера. Фиксированный мазок протравляют 5%-ной хромовой кислотой 2-3 мин., промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, окрашивают карболовым фуксином. Во избежание попадания осадка краски, на мазок предварительно накладывают листок фильтровальной бумаги, а на него уже наносят краску. Препарат снизу подогревают до появления паров, окрашивают 7-8 мин., краску с листком бумажки сливают, не промывая водой, обрабатывают 5%-ным раствором серной кислоты 5-7 с, хорошо промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовой синью 4-5 мин. Вновь промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой, микроскопируют - споры окрашиваются в розово-красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Метод Златогорова отличается от предыдущего лишь тем, что препарат не обрабатывают хромовой кислотой. Результат окраски тот же (споры - красные, вегетативные клетки - синие).

Метод Пешкова. Мазок фиксируют, окрашивают метиленовой синью с подогреванием до кипения, затем смывают водой и докрасивают 1%-ным водным раствором нейтрального красного 10 с, смывают водой, высушивают фильтровальной бумагой. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки - в красный.

Окраска спор по методу Циля

1. Подготовленный на предметном стекле мазок высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки, обрабатывают 5%-ым раствором хромовой кислоты в течение 5-10 мин. и промывают водой.

2. Окрашивают карболовым фуксином Циля при одновременном осторожном нагревании в течение 2-3 мин. Для этого предметное стекло с одного конца берут пинцетом и нагревают над пламенем горелки до появления паров (но не до кипения). По мере испарения красителя необходимо доливать его по каплям, не допуская подсы-

хания. Промывают препарат водой. Микробные клетки остаются окрашенными в красный цвет.

3. Обесцвечивают препарат 1%-м раствором серной кислоты в течение 10-15 с, немедленно промывают препарат водой (споры остаются окрашенными в красный цвет, а микробные клетки обесцвечиваются).

4. Дополнительно окрашивают препарат метиленовым синим около 20 мин. Промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

При правильном окрашивании микробные клетки должны быть синими, споры красными, фон - бесцветный.

3. Методы обнаружения капсул

На клеточных стенках многих бактерий наслаиваются снаружи разной толщины слои материала в большинстве случаев из полисахаридов с высоким содержанием воды – это капсулы и слизь. Капсулы имеют упорядоченное фибриллярное строение с расположением фибрилл вдоль клеточной стенки или перпендикулярно к ней.

В зависимости от толщины и строения различают: микро-, макро-капсулы и слизистые чехлы. Капсулы и слизи не имеют жизненно важного значения для бактерии, но присутствие капсул часто обеспечивает более высокую степень их выживания при неблагоприятных условиях, большую резистентность к некоторым патогенным бактериям и фагоцитозу, повышает их вирулентность.

Наличие капсул у микроорганизмов является непостоянным признаком. Образование капсул зависит от условий внешней среды, состава питательной среды, возраста культуры и др.

Капсулы имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании. Для выявления капсул применяют негативные методы окраски.

Окраска капсул по методу Омелянского

Наносят каплю карболового фуксина Циля и каплю воды на предметное стекло. Помещают в каплю красителя исследуемую культуру бактерий и выдерживают 2-3 мин. Добавляют каплю жидкой черной туши или 10%-го водного раствора нитрозина и тщательно перемешивают. Накрывают покровным стеклом и просматривают с

объективом 40× либо размазывают суспензию по стеклу, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсией.

Красители не проникают в капсулу, поэтому бесцветная капсула хорошо видна на общем темном фоне препарата и окрашенных в красный цвет клеток бактерий.

Окраска капсул по способу Михина

1. Фиксированный мазок окрашивают раствором метиленового голубого в течение 2-3 мин., подогревая до появления паров.

2. Краску быстро смывают водой, мазок просушивают фильтровальной бумагой. Раствор метиленового голубого лучше брать свежего приготовления, поскольку, чем дольше хранится раствор, тем лучше окрашивается препарат.

3. Капсулы окрашиваются в светло-розовый цвет, бактерии – в темно-синий.

Окраска капсул по методу Муромцева

1. Для окраски препаратов используют два раствора. Первый – 0,15 г фуксина основного, 20 см³ 96%-ного спирта, 10 г кристаллической карболовой кислоты; второй – 2,5 г метиленового синего, 200 см³ дистиллированной воды.

2. Оба раствора смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

3. Окрашивание проводят в течение 30 с, затем промывают водой и высушивают. Микрокартина: капсулы – бледно-розовые или бесцветные, микробные клетки – темно-синие (рис.27).

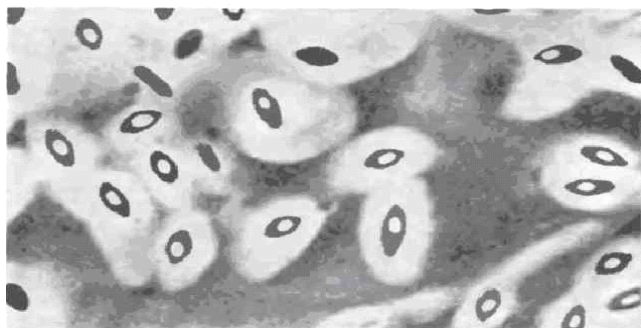


Рис. 27. Споры и капсулы вокруг клеток *Clostridium*

4. Окраска внутриплазматических включений

В процессе жизнедеятельности микроорганизмов в цитоплазме клеток могут формироваться морфологические образования, представляющие либо продукты обмена клетки, либо запасные питательные вещества. Включения различны по своей химической природе. Это могут быть жироподобные вещества, полисахариды (гликоген, крахмал, гранулеза), серополифосфаты (волютин), кристаллы щавелевой кислоты и др. Они не являются постоянными компонентами клетки, они образуются в зависимости от условий культивирования, возраста культуры и могут использоваться в метаболизме клетки.

Клеточные включения могут выявляться цитохимическими методами.

Окраска полисахаридов (гликогена и гранулезы)

1. На предметное стекло наносят небольшую каплю микробной суспензии, добавляют каплю концентрированного раствора Люголя и выдерживают 10-15 мин. при комнатной температуре.

2. Накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости и микроскопируют с сухой системой либо с иммерсией.

Гранулы крахмалоподобных веществ (гранулеза) окрашены в синий, а гранулы гликогенподобных веществ (крахмал) - в красновато-коричневый цвет.

Окрашивание гликогена происходит в кислой среде, поэтому перед выявлением в клетках гликогена среду, в которой выращивали микроорганизмы, подкисляют, либо на предметное стекло вместо воды наносят каплю 0,5%-го раствора HCl и в ней эмульгируют исследуемую культуру.

Окраска жироподобных веществ

1. Наносят каплю густой микробной взвеси на предметное стекло. Добавляют каплю формалина (40%-го), либо 5%-го раствора HCl и выдерживают 5 мин. (формалин убивает клетку и разрыхляет ее оболочку).

2. Добавляют каплю метиленового синего (1:10 либо 1:40) и выдерживают 10 мин.

3. Добавляют каплю концентрированного раствора судана (III) в

90%-м этаноле и выдерживают 5 мин. Накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с сухой или иммерсионной системой.

Клетки окрашены в синий, включения жира - в розово-оранжевый цвет.

Окраска полифосфатов по Омелянскому

1. Готовят мазок на предметном стекле, высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. Заливают препарат карболовым фуксином Циля на 0,5-1,0 мин.

2. Сливают краситель, промывают препарат водой и обесцвечивают 20 - 30 с 1%-ным раствором серной кислоты. Сливают кислоту, промывают препарат водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим (1:40) в течение 20-30 с. Промывают препарат водой, высушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют с иммерсионной системой.

Волютин окрашен в красный, а цитоплазма - в синий цвет.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют способы окрашивания, цели?
2. Красители, используемые в микробиологической практике: характеристика, свойства.
3. Объясните существование корреляции между строением клеточной стенки микроорганизмов и результатами окраски по Граму?
4. В чем заключается сущность методов окрашивания спор бактерий?
5. На каком свойстве капсул основаны методы их окрашивания?
6. На чем основаны методы выявления запасных веществ (полисахаридов, полифосфатов, жироподобных веществ) в клетках?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Володькина, Г.М. Микробиология однородных групп товаров, санитария и гигиена : учебное пособие / Г.М. Володькина. – Тверь : Тверская ГСХА, 2019. – 181 с. // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/134250>
2. Гернет, М. В. Микробиология: Учебник / Гернет М.В., Ильяшенко Н.Г., Шабурова Л.Н. - М.:НИЦ ИНФРА-М, 2020. - 263 с. (Высшее образование: Бакалавриат) ISBN 978-5-16-015357-5. - Текст : электронный. - URL: <https://znanium.com/catalog/product/>
3. Госманов, Р. Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии : учебное пособие / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, А. А. Барсков. – Санкт-Петербург : Лань, 2014. – 384 с. – ISBN 978-5-8114-1625-7. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/45680>
4. Кисленко, В. Н. Микробиология. Практикум : учебное пособие / В. Н. Кисленко. – Москва : ИНФРА-М, 2020. – 239 с. – (Высшее образование: Бакалавриат). - ISBN 978-5-16-015071-0. - Текст : электронный. - URL: <https://znanium.com/catalog/product/1016621>
5. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология : учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург : Лань, 2019. – 624 с. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/125742>
6. Костенко, Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии [Текст] / Т. С. Костенко, Е. И. Скаршевская, С. С. Гительсон. - М. : Агропромиздат, 1989. - 272 с. - (Учеб. и учеб. пособия для студентов вузов). - ISBN 5-10-000679-X.
7. Микробиологическая лаборатория и ее оборудование: методические рекомендации по выполнению лабораторных работ для студентов очной и заочной форм обучения, квалификация – бакалавр / Б.Г. Цугкиев, Э.В. Рамонова, Р.Г. Кабисов. – Владикавказ: ФГБОУ ВПО «Горский госагроуниверситет», 2015. – 28 с.
8. Микробиология пищевых продуктов: учебное пособие / составители Т.И. Михалева [и др.]. – Курск: Курская ГСХА, 2018. – 58 с. // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/134845>.

9. Микробиология: учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2019. – 496 с. – ISBN 978-5-8114-1180-1. // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/112044>

10. Нецепляев, С. В. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения / С.В. Нецепляев, А.Я. Панкратов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 223 с.

11. Плешакова, В. И. Микробиология : учебное пособие / В. И. Плешакова, Н. А. Лещёва, Т. И. Лоренгель. – Омск : Омский ГАУ, 2019. – 75 с. – ISBN 978-5-89764-826-9. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/126624>

12. Сахарова, О.В. Общая микробиология и общая санитарная микробиология: учебное пособие / О.В. Сахарова, Т.Г. Сахарова. – 2-е изд., испр. – Санкт-Петербург: Лань, 2019. – 224 с. – ISBN 978-5-8114-3798-6. // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/123667>

13. Цугкиев, Б.Г. Видовое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих лактозу, в Республике Северная Осетия – Алания и их практическое использование: монография / Б. Г. Цугкиев [и др.]. – Владикавказ: ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2015. – 240 с. – ISBN 978-5-906647-35-1.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1	4
Тема. Общая характеристика живых систем	4
1. Морфология бактерий	7
2. Морфология цианобактерий	12
3. Морфология актиномицетов	13
4. Морфология грибов	16
5. Морфология микроводорослей	22
6. Морфология простейших	24
Контрольные вопросы.....	25
ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №2	27
Тема. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней	27
1. Подготовка микробиологической лаборатории к работе	27
2. Правила работы в микробиологической лаборатории	30
3. Правила работы с культурами микроорганизмов	32
Контрольные вопросы.....	37
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №1	38
Тема. Микроскопия	38
1. Светлопольная микроскопия. Установка света по Келеру	42
2. Микроскопия в темном поле	44
3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством	44
4. Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия	45
5. Электронная микроскопия	46
Контрольные вопросы.....	48
ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №3	49
Тема. Изучение микроорганизмов в светлопольном микроскопе ..	49
1. Препараты живых клеток микроорганизмов. Негативный способ окраски	55
2. Приготовление фиксированных препаратов. Простая окраска клеток	57

3. Определение размеров микробных клеток.....	60
Контрольные вопросы.....	63
ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №2	65
Тема. Специальные методы окраски микроорганизмов	65
1. Окраска клеток по Граму.....	65
2. Окраска спор	68
3. Методы обнаружения капсул	71
4. Окраска внутриплазматических включений	73
Контрольные вопросы.....	74
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	75



Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Подписано в печать 23.01.25 г. Бумага писчая. Печать трафаретная.
Бумага 60x84 1/16. Усл. печ. л. 5. Тираж 10. Заказ 9.

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.
Типография ФГБОУ ВО Горский ГАУ

б б б

б б б

ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

(Раздел 2. Структурно-морфологические особенности
и систематика клеток микроорганизмов)

Методические указания к выполнению
лабораторных и практических занятий
для студентов по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

б б б

б б б