

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

И. И. КОНЦЕВАЯ

**МИКРОБИОЛОГИЯ:
МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

Практическое пособие

для студентов
специальностей 6-05-0511-01 «Биология»,
6-05-0113-03 «Природоведческое образование (биология, химия)»

Гомель
ГГУ им. Ф. Скорины
2025

УДК 579.2(076)
ББК 28.4я73
К64

Рецензенты:

кандидат биологических наук С. Н. Мельник,
кандидат химических наук Н. И. Дроздова

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Концевая, И. И.

К64 Микробиология: морфология и структурная организация
бактериальной клетки : практическое пособие / И. И. Концевая ;
Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель : ГГУ им.
Ф. Скорины, 2025. – 46 с.
ISBN 978-985-32-0083-6

Практическое пособие ставит своей целью оптимизировать учебно-познавательную деятельность студентов по усвоению материала раздела «Морфология и структурная организация бактериальной клетки». Последовательно рассматриваются основные программные вопросы дисциплины «Микробиология»: методы стерилизации, хранение культур микроорганизмов, приготовление нативных и фиксированных препаратов микроорганизмов, изучение морфологии клеток с использованием методов микроскопии. Оно может быть использовано как на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Микробиология», так и для самостоятельной подготовки.

Адресовано студентам биологических специальностей 6-05-0511-01 «Биология», 6-05-0113-03 «Природоведческое образование (биология, химия)».

УДК 579.2(076)
ББК 28.4я73

ISBN 978-985-32-0083-6

© Концевая И. И., 2025
© Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины», 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	4
1 Методы стерилизации. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов.....	5
1.1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории.....	5
1.2 Определение понятий «асептика», «антисептика», «дезинфекция», «стерилизация».....	6
1.3 Методы стерилизации.....	7
1.4 Методы хранения культур микроорганизмов.....	12
Практическое занятие 1.....	15
2 Микроскопические методы исследования в микробиологии: устройство микроскопа и основные приемы микроскопирования живых микроорганизмов.....	19
2.1 Особенности разных видов микроскопии.....	19
2.2 Устройство светлопольного микроскопа.....	23
2.3 Правила работы с иммерсионным объективом.....	27
2.4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов.....	28
Практическое занятие 2.....	30
3 Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и изучение морфологии клеток.....	33
3.1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов.....	33
3.2 Схематичное строение бактериальной клетки.....	35
3.3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.....	36
3.4 Простые и сложные методы окраски.....	38
Практическое занятие 3.....	43
Литература.....	46

ПРЕДИСЛОВИЕ

Микробиология – один из фундаментальных биологических курсов. Знание микробиологии необходимо для формирования мировоззрения об огромной роли микроорганизмов в природе и в жизни человека.

На лабораторных занятиях по разделу «Морфология и структурная организация бактериальной клетки» студенты знакомятся с правилами работы в учебной микробиологической лаборатории, овладевают специальными приемами, необходимыми для практической работы с микроорганизмами, получают знания о правилах работы с иммерсионным объективом, а также, используя накопительные культуры бактерий, вырабатывают технические навыки микроскопирования живых микроорганизмов и овладевают техникой приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов. Представленный материал позволит студентам закрепить свои знания о морфологии и размерах клеток микроорганизмов, о структурной организации бактерий.

Материал каждого занятия начинается с плана, включает изложение теоретической части и вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля. Далее перечисляются материалы и оборудование, необходимые на занятии, ставится цель занятия, перечисляются задания для самостоятельной работы студентов на лабораторном занятии. Результаты наблюдений морфологических особенностей микроорганизмов студенты оформляют в виде рисунков, к которым следует предъявить строгие требования, считая зарисовку объектов одним из важнейших методов исследования.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса. Студенты, отработавшие лабораторные занятия, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследований.

Целью практического пособия является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами микробиологии и выработке практических навыков работы с культурами микроорганизмов. Материал практического пособия делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества.

1 МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ. ПОДЕРЖАНИЕ (ХРАНЕНИЕ) КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории.

1.2 Определение понятий «асептика», «антисептика», «дезинфекция», «стерилизация».

1.3 Методы стерилизации.

1.4 Методы хранения культур микроорганизмов.

1.1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории

Основное правило работы в микробиологической лаборатории – **правильная организация работы.**

Общие правила работы

1 К работе в лаборатории допускаются лица после прохождения инструктажа по технике безопасности.

2 Все должны работать в медицинских халатах. Вход без халата воспрещен. Необходимо иметь сменную обувь.

3 Каждый студент имеет в лаборатории постоянное рабочее место и микроскоп для работы.

4 Каждый студент на занятии должен иметь тетрадь протоколов лабораторных работ, простой и цветные карандаши, ластик, линейку.

5 На каждое занятие назначают дежурных.

6 На рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов. Рабочее место должно содержаться в образцовом порядке, а личные вещи храниться в специально отведенных местах.

7 Перед началом работы и после ее окончания следует тщательно вымыть руки, а при необходимости – обработать дезинфицирующим раствором.

8 При попадании биологического материала на стол и т. д., это место необходимо тщательно вытереть дезинфицирующим раствором.

9 Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны помещать в сосуд с дезинфицирующим раствором либо специальные кюветы. Пинцеты, бактериальные петли, иглы прожигать в пламени горелки.

10 Отработанные культуры, использованный микробный материал подвергать обеззараживанию в автоклаве.

11 В ходе выполнения работы оформляется отчет – протокол соответствующего лабораторного занятия.

Запрещается

1 Работать без халатов, выпускать из-под спецодежды шарфики и длинные манжеты, а из прически выпускать волосы.

2 Входить в учебную лабораторию в головных уборах и верхней одежде.

3 В лаборатории запрещается курить и принимать пищу. Не допускать излишних разговоров и ненужных переходов.

4 Класть на столы сумки и пакеты.

5 Включать мобильные телефоны во время занятий.

6 Принимать во время перерыва посетителей в лаборатории.

После окончания работы студенты должны:

1 Привести в порядок рабочее место.

2 Отработанные материал и инструменты, в том числе стекла, поместить в специальный кювет.

3 Привести в порядок микроскоп.

4 Тщательно вымыть руки с мылом.

5 Подать протокол работы преподавателю для подписи.

Работа студентов по подготовке к занятию

Подготовка к лабораторным занятиям проводится согласно тематическому плану по вопросам методического руководства. В процессе подготовки студент должен изучить прорабатываемую тему по рекомендуемой литературе, конспекту лекций, практическому руководству.

1.2 Определение понятий «асептика», «антисептика», «дезинфекция», «стерилизация»

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на (в) какой-либо объект. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию инструментов и материалов.

Антисептика обозначает использование химических веществ, убивающих или подавляющих размножение микроорганизмов, находящихся на коже или слизистых оболочках макроорганизма.

Дезинфекция – уничтожение на (в) каком-либо объекте или окружающей среде микробов. Для дезинфекции используют фенол,

формалин, спирт, соединения хлора (хлорамин, хлорную известь), йод, сулему, диацид, перекись водорода и т. д., а также термические, лучевые и другие воздействия.

Стерилизация – процесс, направленный на полное уничтожение в объекте всех жизнеспособных микроорганизмов и их спор.

Знание и умелое применение методов стерилизации необходимо каждому специалисту микробиологу.

1.3 Методы стерилизации

Стерилизации подвергаются питательные среды, растворы, лабораторная посуда, инструменты, оборудование и т. д. Можно условно выделить термическую и холодную стерилизацию.

К методам термической стерилизации (стерилизации высокой температурой) относят: прокаливание и обжигание в пламени спиртовки; кипячение; сухожаровую (горячим паром) стерилизацию; пастеризацию; стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование); дробную стерилизацию (тиндализацию).

Прокаливание и обжигание в пламени (фламбирование) – наиболее быстрые и доступные методы стерилизации. При обжигании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (до 1 560 °С), поэтому не следует опускать петлю низко к горелке (рисунок 1.1). При прокаливании происходит сгорание микроорганизмов и их спор. Такими методами стерилизуют бактериологические петли, иглы (рисунок 1.2), шпатели, пинцеты, предметные и покровные стекла, горловины сосудов, фарфоровые ступки и другие инструменты.

Вблизи от пламени создается стерильная зона диаметром 10–15 см. В этой зоне осуществляют различные манипуляции с микробами, предотвращая загрязнение внешней среды. Мелкий инструментарий (петли и др.) стерилизуют непосредственно в пламени горелки; более крупный инструментарий (шпатели, пинцеты) – после смачивания спиртом.

При **обжигании бактериологической петли (или иглы)** проволоку прокалывают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. При прокаливании петлю держат в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерна раскалена. Стерильную петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами, не допуская касания стенок сосуда.

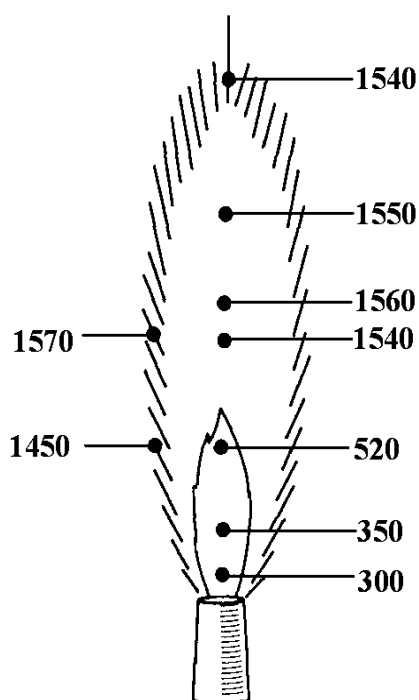


Рисунок 1.1 –
Значение температуры (°C)
в разных участках пламени
газовой горелки

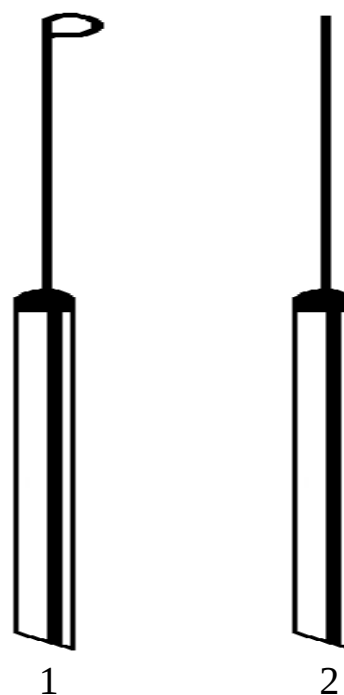


Рисунок 1.2 –
Бактериологическая петля (1)
и бактериологическая игла (2)

Кипячение – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют, например, мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30–60 мин с момента энергичного закипания воды. В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко, поскольку длительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности.

Тиндализация (дробная стерилизация или стерилизация текущим паром) используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые изменяют свойства при применении температур выше 100 °C. К таким объектам относятся витамины, некоторые питательные среды, сыvorотка крови и т. д. Эти материалы стерилизуют методом тиндализации, который предполагает их прогревание при 70–100 °C в течение часа на протяжении трех последовательных дней с инкубационным периодом между ними. В период инкубации прорастают устойчивые споры, которые погибают в результате нагревания на следующий день.

При тиндализации резервуар с кипящей водой расположен в нижней части аппарата, над ним расположена сетка с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами. Метод разработан в 1877 году Дж. Тиндалем.

Основной недостаток тиндализации – невозможность полной элиминации микроорганизмов, так как некоторые споры не успевают прорасти по времени между циклами прогревания, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры.

Сухожаровая стерилизация или стерилизация сухим горячим воздухом проводится в сушильных шкафах, в частности, марки ШС-80-01 СПУ. При этом предполагается, что погибают как клетки, так и споры. Таким способом стерилизуют стеклянную посуду (таблица 1.1), инструменты, минеральные и растительные масла, жиры, вазелин, воск и др., завернутые в бумагу или содержащиеся в сосудах, закрытых ватно-марлевыми пробками, для сохранения стерильности после стерилизации.

Таблица 1.1 – Условия стерилизации стеклянной посуды сухим жаром (горячим воздухом)

Температура, °С	Время, мин
140	180
150	150
160	120
170	60

Пастеризация заключается в однократном прогреве материала при температурах ниже 100 °С и направлена на уничтожение вегетативных клеток. Этот метод широко используется в пищевой промышленности для обработки продуктов, которые теряют вкусовую и пищевую ценность при кипячении: молока, ягодных и фруктовых соков, пива и т. д. В микробиологической практике пастеризацией пользуются для получения накопительных культур спорообразующих бактерий. Пастеризацию проводят, например, на водяной бане при следующих режимах: 60–70 °С в течение 15–30 мин; 80 °С в течение 10–15 мин.

Стерилизация насыщенным паром под давлением или автоклавирование – один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию высокой температуры и повышенному давлению пара. Погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных приборах – автоклавах, закрывающихся герметично. Практичны в работе автономные паровые стерилизаторы. Основные используемые режимы стерилизации следующие: 15–30 мин при избыточном давлении 0,5 атм (температура достигает 110–112 °С);

15–45 мин при избыточном давлении 1,2 атм (температура достигает 120–121 °С). Таким способом стерилизуют питательные среды, растворы, посуду, фильтры и т. д.

При **холодной стерилизации** используют химические вещества или проводят воздействие на объект факторами физической природы. Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов предполагают использование дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифический эффект, либо использование антибиотиков и других антимикробных препаратов с избирательным действием на клетку.

Химические соединения могут быть: жидкими или газообразными.

Дезинфицирующие жидкие вещества классифицируются по группам: кислоты, щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые основания, фенольные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. Устойчивость микроорганизмов к их действию может существенно меняться в зависимости от таких факторов как концентрация активного компонента, длительность контакта, рН, температура, влажность, присутствие органического вещества. Химические средства неспецифического действия используются для обработки помещений, оборудования, различных предметов. Летучие стерилизующие вещества могут применяться для стерилизации пластмассовых пробирок, пластмассовых чашек Петри и др. Процедуры химической стерилизации могут представлять опасность для здоровья пользователей (например, ядовитость, огнеопасность).

Стерилизация фильтрованием используется для веществ, которые не выдерживают термической обработки (растворов белков, аминокислот, витаминов, антибиотиков). Способ заключается в пропускании жидкостей и газов через фильтры, диаметр пор которых не превышает 0,20–0,45 мкм. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление.

Процесс фильтрации не уничтожает, а удаляет микроорганизмы.

Существуют два основных **типа фильтров** – **глубинные** и **мембранные**. Фильтры, изготовленные из фаянса или асбеста, называются *глубинными фильтрами*. Основными механизмами их фильтрации являются просеивание, адсорбция и улавливание в матрице фильтрующего материала. Мембранные фильтры используются: для обработки биологических продуктов, воздуха и других газов для подачи в асептические зоны, в промышленности – как часть вентиляционных систем ферментеров, центрифуг, автоклавов и сублимационных сушилок. Мембранные фильтры используются для проверки стерильности.

Стерилизация ультразвуком. Ультразвук является физическим стерилизующим фактором и используется, например, для обеззараживания воды, молока, кожевенного сырья. Стерилизующее действие его связано с разрушением бактериальной клетки под действием возникающих в цитоплазме кавитационных пузырьков.

Стерилизация с использованием облучения пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые (УФ) лучи с длиной волны 250–270 нм используются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток, для стерилизации воздуха закрытых помещений, поверхностей, лабораторного оборудования, потолков, стен и полов, и т. д. Время облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. УФ-свет изменяет нуклеиновые кислоты и приводит к образованию димера пиримидина, тем самым ингибируя репликацию ДНК и приводя к гибели микроорганизмов. Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые в 3–10 раз более устойчивы. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью, стеклом или другим покрытием.

Недостатком при использовании данного метода стерилизации является низкая проникающая способность УФ-лучей.

Рентгеновское и γ -облучение проникают через бумагу, дерево, стекло, ряд металлов и другие материалы, вызывая гибель микроорганизмов в короткий промежуток времени. Когда ионизирующее излучение проходит через клетки, в них образуются свободные радикалы водорода, гидроксильные радикалы и перекиси, которые вызывают внутриклеточные повреждения, приводящие к уничтожению микробов. Наиболее чувствительны к γ -облучению вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад. γ -облучение используется для стерилизации антибиотиков, витаминов, гормонов, пластмассового разового оборудования, шовного и перевязочного материала. При этом необходим контроль остаточной радиации изделий.

Основные преимущества лучевой стерилизации: возможность обработки термолабильных материалов, стерилизации объектов в упакованном виде, включение стерилизации в производственный процесс. В связи со специфическими требованиями по технике безопасности работы с источниками этих излучений, а также высокой стоимостью, они используются в практике работы только крупных предприятий.

1.4 Методы хранения культур микроорганизмов

Основная задача хранения культур – поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и производства. Проблема длительного хранения микроорганизмов сводится к торможению процессов обмена веществ. Хранение микроорганизмов осуществляется в специальных коллекциях типовых культур. В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими пересевами (субкультивированием); 2) под минеральным маслом; 3) высушиванием; 4) лиофилизацией; 5) в условиях низких и ультранизких температур.

Субкультивирование – традиционный метод хранения культур (чаще всего аспорогенных), который заключается в пересевах культур на свежие питательные среды, обычно сроком один раз в 4–12 месяцев. Между пересевами микроорганизмы хранят в темноте при температурах 0–20 °С. Удобно использовать в работе **холодильник бытовой**. При применении этого метода хранения культур должны быть соблюдены три условия: 1) подходящая поддерживающая среда; 2) идеальная температура хранения; 3) необходимая частота пересевов.

Преимуществом метода является простота и удобный визуальный контроль за чистотой культуры или ее морфологической изменчивостью; а к недостаткам следует отнести возможность заражения, не позволяет предотвратить изменения характеристик штамма в результате развития вариантов и мутантов, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов.

Хранение под минеральным маслом (парафиновый метод) заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным минеральным маслом. Слой масла (0,5–1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов и предотвращает обезвоживание среды. Данный подход помогает микроорганизмам оставаться в спящем состоянии, поэтому культура может сохраняться от нескольких месяцев до нескольких лет. Такие культуры можно хранить при комнатной температуре или в холодильнике. Большинство сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение 8–14 лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересевуют через 2–3 года.

Хранение под маслом имеет следующие преимущества: относительно длительное сохранение стабильности свойств микроорганизмов, сокращение затрат на пересевы, не требует специального оборудования.

Также мы можем удалить часть культуры под маслом с помощью бактериальной иглы, инокулировать ее в свежую среду и при этом сохранить исходную культуру. Простота и экономичность метода делает его привлекательным, но изменения в характеристиках штамма все равно могут произойти.

Высушивание – простейший метод хранения микроорганизмов, в процессе которого происходит обезвоживание микробных клеток. В высушенных (до остаточной влажности 10–12 %) клетках биохимические реакции приостанавливаются или протекают очень медленно. Процесс высушивания лучше переносят спорообразующие виды. Широко применяют воздушное высушивание микроорганизмов на различных адсорбентах: в стерильном песке, фильтровальной бумаге, стеклянных бусах, крахмале и т. д. Адсорбенты защищают микроорганизмы от пересыхания, связывают свободную воду и поддерживают определенный уровень влажности. Разновидностью метода является *L*-высушивание: микроорганизмы в суспензионной среде высушивают под вакуумом в стеклянных ампулах, погруженных в водяную баню с контролируемой температурой.

Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать, они широко используются для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, бактериальных удобрений, энтомопатогенных препаратов.

Лиофилизация (сублимационная сушка) заключается в удалении воды из замороженных суспензий под вакуумом. Сублимация происходит, когда вода испаряется, минуя жидкую фазу.

Этот метод считается одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения микроорганизмов. Его использование позволяет сохранять многие разнородные группы бактерий и бактериофагов в темноте при температуре 4 °С на протяжении 30 и более лет. Выживаемость лиофилизированных клеток зависит от специфических особенностей вида и штамма, стадии роста и концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий реактивации.

При подготовке клеток к лиофилизации их концентрированную суспензию (10^9 – 10^{10} кл/мл) переносят в среду, содержащую протекторы: сыворотку крови, желатин, молоко, полиэтиленгликоль и др. и затем по 0,2 мл помещают в специальные ампулы. Для лиофилизации используют различные аппараты, простейшим из которых является эксикатор, который охлаждают, чтобы клеточная суспензия во время подключения к вакууму оставалась замороженной. Длительность замораживания–высушивания – 5–6 часов. В таких условиях микробные

клетки обезвоживаются, их метаболическая активность прекращается, микробы переходят в спящее состояние и сохраняют жизнеспособность в течение более чем 30 лет. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят при 4 °С в темноте. После лиофилизации для выведения клеток из состояния анабиоза создают условия, снижающие осмотический шок, возникающий при вскрытии ампул. Лучше всего восстановление свойств происходит на богатых натуральных средах.

Преимущества лиофилизации:

- 1) требуется минимальное пространство для хранения; сотни лиофилизированных культур могут храниться на небольшой площади;
- 2) небольшие флаконы можно удобно отправлять по почте в другие микробиологические лаборатории, если они упакованы в специальный герметичный почтовый контейнер;
- 3) лиофилизированные культуры можно оживить, открыв флаконы, добавив жидкую среду и перенеся дегидратированную культуру в оптимальную по составу среду для роста.

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах используется в тех случаях, когда культуры не выдерживают лиофилизации (спирохеты, микоплазмы, различные вирусы). Микроорганизмы замораживают при температурах от –12 °С до –80 °С, либо используют рефрижераторы с азотом (до –196 °С).

При хранении бактерий в жидком азоте используют криопротекторы двух типов: 1) глицерин и диметилсульфоксид, которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутри-, так и внеклеточную защиту; 2) сахароза, глюкоза, полиэтиленгликоль обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны.

По 0,4 мл суспензии клеток (10^8 кл/мл) разливают в специальные ампулы, которые запаивают. Далее проводят двухэтапное охлаждение: с медленной (снижение температуры 1 °С/мин) и быстрой (снижение температуры 15–30 °С/мин) скоростью. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают при 37 °С.

К основным преимуществам криогенного сохранения микроорганизмов можно отнести: малую вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, небольшие временные и материальные затраты, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята. Однако этот метод по сравнению с другими является дорогостоящим.

Сравнительный анализ использования различных методов хранения культур микроорганизмов приведен в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Время выживания бактерий при хранении

Род бактерий	Частота пересевов при субкультивировании, месяцы	Время выживания, годы				
		под минеральным маслом	в стерильной почве	при замораживании	после лиофилизации	в жидком азоте
<i>Actinomyces</i>	1	–	1–2	2–3	> 30	> 30
<i>Bacillus</i>	2–12	1	1–2	2–3	> 30	> 30
<i>Bifidobacterium</i>	еженед.	–	–	–	> 30	> 30
<i>Clostridium</i>	6–12	1–2	–	2–3	> 30	> 30
<i>Escherichia</i>	1–4	1–2	–	–	> 30	> 30
<i>Erwinia</i>	1–4	1–2	–	–	> 30	> 30
<i>Nocardia</i>	1–4	1	–	1–2	> 30	> 30
<i>Pseudomonas</i>	1–3	–	–	1	> 30	> 30
<i>Streptococcus</i>	1–2	1	–	–	> 30	> 30
<i>Streptomyces</i>	1–8	1–2	2–3	1–3	> 30	> 30
Примечание: «–» – нет данных						

Вопросы для самоконтроля

1 Перечислите общие правила работы в учебной микробиологической лаборатории.

2 Дайте определения понятий «асептика», «антисептика», «дезинфекция», «стерилизация».

3 Перечислите и охарактеризуйте основные методы термической и холодной стерилизации.

4 Перечислите методы поддержания культур микроорганизмов в коллекциях, охарактеризуйте их.

Практическое занятие 1

Цель: ознакомление с методами стерилизации и методами хранения культур микроорганизмов.

Материалы и оборудование: пинцеты, бактериальные петли и шпатель, колбы и пробирки с ватными пробками, чашки Петри, предметные стекла, пипетки, бумага, держатели, спиртовки, спички.

Ход работы

Задания на 6 баллов: выполните пункты 1–5, 7.

Задания на 10 баллов: выполните работу на 6 баллов, а также пункт 6.

1 Ознакомиться с правилами работы и техникой безопасности в учебной микробиологической лаборатории.

2 Ознакомиться с устройством микробиологической лаборатории биологического факультета и ее оборудованием.

3 Освоить технику подготовки лабораторной посуды (чашки Петри, металлических инструментов, пипеток к стерилизации).

4 Отработать приемы прокаливания и обжигания в пламени бактериологических петель, предметных стекол.

5 Охарактеризовать и записать в рабочую тетрадь способы стерилизации материала, согласно схеме таблицы 1.3.

Таблица 1.3 – Способы стерилизации материала

№ п/п	Стерилизуемый материал	Метод стерилизации, режим стерилизации	Примечание (в каком виде, сосудах)
1	Питательные плотные среды, содержащие сахара, разлагающихся при 120 °С		в сосудах, закрытых пробками
2	Чашки Петри (стеклянные), пипетки, шпателя		завернуты в бумагу
3	Чашки Петри из термолабильной пластмассы		
4	Растворы витаминов, антибиотиков		
5	Молоко, соки, сиропы, пиво, вино		
6	Сыпучие среды (жмых, отруби, зерно)		
7	Растительный материал (корни, плоды)		

6 В таблице 1.4 приведены распространенные антимикробные агенты, однако особенности их действия размещены в неправильной последовательности. Необходимо: 1) соотнести агент с особенностью его действия, сделав запись в рабочей тетради, например, 1 – к и т. д.; 2) заполнить таблицу 1.4 в тетради после корректного исправления в очередности изложения материала в столбце «Особенности действия».

Таблица 1.4 – Характеристика распространенных антимикробных агентов из числа дезинфектантов и антисептиков

Агент	Особенности действия
1 Атомарный кислород	а) денатурируют белки, растворяют липиды мембран, что приводит к нарушению их проницаемости и разрушению. В малых концентрациях используются как антисептики, в больших – как дезинфектанты
2 Галогены	б) обладают бактерицидным и фунгицидным действием, но малоэффективны против эндоспор и некоторых вирусов; этанол и изопропанол в виде 70 %-ных растворов обычно применяются как дезинфектанты и антисептики. Денатурируют белки и растворяют мембранные липиды
3 Озон (О ₃)	в) мыла и детергенты применяются для механического удаления микроорганизмов с поверхности кожи. Анионные детергенты (стиральные порошки) обладают таким же действием по отношению к тканям. Катионные детергенты обладают антимикробным действием, способны встраиваться в мембраны, нарушая их проницаемость и приводя к деструкции
4 Оксид этилена (газ)	г) серебро, медь, ртуть, цинк обладают биоцидным действием, их соли используются как дезинфектанты и антисептики. Связывают сульфгидрильные группы ферментов и кофакторов, обуславливая их инактивацию
5 Поверхностно-активные вещества	д) хлорирование широко применяется для дезинфекции питьевой воды, бассейнов, обеззараживания сточных вод; хлор в воде образует хлорноватистую кислоту – мощный окислитель. Иод – эффективный антисептик в виде 2–3 %-ных растворов в 70 %-ном этаноле, инактивирует белки; йодоформ – дезинфектант и антисептик
6 Соли тяжелых металлов	е) используется в виде 5 %-ных растворов. Вызывает денатурацию белков, вступая с ними в реакции. Обладает микробицидным действием по отношению к вегетативным клеткам, спорам, вирусам (универсален)
7 Спирты	ж) алкилирующий агент с широким спектром биоцидного действия, активен и против эндоспор, применяется для дезинфекции термолabileльных материалов (резина, пластик)
8 Фенолы	и) сильный окислитель и мутаген, используется для дезинфекции воды, овощей и фруктов в хранилищах
9 Формальдегид	к) выделяется при разложении во влажной среде хлорной извести, перманганата калия, пероксида водорода. Окисляет различные клеточные соединения, обуславливая быструю гибель микроорганизмов. Широкий спектр действия. Названные соединения применяются как антисептики и дезинфектанты

7 Используя сведения п. 5 настоящего практического пособия и данные таблицы 1.2, заполнить таблицу 1.5.

Таблица 1.5 – Преимущества и недостатки различных методов хранения культур микроорганизмов (м/о)

Методы хранения культур м/о	Преимущества	Недостатки	Группы м/о	Время выживания, г
Субкультивирование				
Хранение под минеральным маслом				
Высушивание				
Лиофилизация				
Хранение при ультранизких температурах				

2 МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ: УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ ЖИВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1 Особенности разных видов микроскопии.

2.2 Устройство светлопольного микроскопа.

2.3 Правила работы с иммерсионным объективом.

2.4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов.

2.1 Особенности разных видов микроскопии

Основными задачами микроскопии являются следующие:

- выявление микроорганизмов в различных материалах;
- ориентировочная идентификация микроорганизмов в образце;
- изучение некоторых морфологических признаков и структур микроорганизмов (например, капсул, жгутиков и т. д.);
- изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

На сегодняшний день наиболее используемой является световая микроскопия.

Световая микроскопия обеспечивает увеличение до 2–3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст).

Основными характеристиками любого микроскопа являются разрешающая способность и контраст.

Разрешающая способность – это минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм.

Контраст изображения – это различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3–4 %, то его невозможно уловить ни глазом, ни фотопластинкой; тогда изображение останется невидимым, даже если микроскоп разрешает его детали. На контраст влияют как свойства объекта, изменяющие световой поток по сравнению

с фоном, так и способности оптики уловить возникающие различия в свойствах луча. Возможности светового микроскопа ограничены волновой природой света. Физические свойства света – цвет (длина волны), яркость (амплитуда волны), фаза, плотность и направление распространения волны изменяются в зависимости от свойств объекта. Эти различия и используются в современных микроскопах для создания контраста.

Увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. У типичных исследовательских микроскопов увеличение окуляра равно 10, а увеличение объективов – 10, 40 и 100. Соответственно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1 000. Некоторые из микроскопов имеют увеличение до 2 000. Еще более высокое увеличение не имеет смысла, так как при этом разрешающая способность не улучшается. Напротив, качество изображения ухудшается.

Числовая апертура используется для выражения разрешающей способности оптической системы. Числовая апертура – это оптический «охват» линзы, она является мерой количества света, попадающего в линзу. Числовая апертура объектива указана на его оправе. Апертура конденсора должна соответствовать числовой апертуре объектива. Числовая апертура любой линзы, граничащей с воздухом (т. е. «сухой системы»), не может превысить 1, так как показатель преломления воздуха равен 1. Числовую апертуру можно повысить, если увеличить показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом, приблизив его к показателю преломления стекла (1,5). Для этого между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом помещают каплю жидкости с показателем преломления большим, чем показатель преломления воздуха, например, каплю воды ($n = 1,3$), глицерина ($n = 1,4$) или иммерсионного масла ($n = 1,5$). Для каждой из указанных выше жидкостей выпускаются специальные объективы, которые называются *иммерсионными*.

Световая микроскопия включает *просвечивающую микроскопию (светло-, темнопольную), фазово-контрастную, люминесцентную*. Разработаны и иные способы микроскопии и микроскопы – *инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия*.

Светлопольная микроскопия основана на формировании изображения под воздействием проходящего пучка света. Данный вид микроскопии предназначен для исследования морфологии, размеров клеток, их взаимного расположения, структурной организации клеток

и других особенностей. У светового микроскопа максимальная разрешающая способность составляет 0,2 мкм, что обеспечивает высокоточное увеличение микроскопа до 2000х.

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света, в этом случае они не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Такое освещение препарата достигается применением специального темнопольного конденсора. Темнопольная микроскопия является очень простым, но эффективным методом и хорошо подходит для получения изображения живых и неокрашенных биологических образцов. При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, что находится за пределами разрешающей способности обычного светлопольного микроскопа. Однако наблюдение за объектами в темном поле позволяет исследовать только контуры клеток и не дает возможности рассмотреть их внутреннюю структуру.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет более четко наблюдать живые прозрачные объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды. Действие фазово-контрастного микроскопа основано на интерференции света в плоскости изображения, обусловленной сдвигом по фазе (при использовании фазового кольца в апертурной диафрагме). При фазово-контрастной микроскопии часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики – инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху.

С помощью фазово-контрастной микроскопии изучают форму, размеры, взаимное расположение клеток, их подвижность, размножение, прорастание спор микроорганизмов и т. д. Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст).

Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей светиться при их освещении невидимым ультрафиолетовым или синим светом. При использовании ультрафиолетового света разрешающая способность микроскопа может достигать до 0,1 мкм. С применением масляной иммерсии увеличение микроскопа составляет 1000–1500х.

Клетки микроорганизмов обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500–1:100000. Такие растворы слабо токсичны, что позволяет изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава, клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и люминесцируют различным образом. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это дает возможность использовать данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток и т. д.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ) дает возможность получить отчетливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. Данный метод пригоден лишь для исследования самосветящихся (флуоресцентных) объектов. При сочетании с компьютерной техникой возможна пространственная реконструкция изучаемого объекта.

В конфокальном лазерном сканирующем микроскопе изображения внутренних сечений формируются за счет сканирования сфокусированным лазерным пучком от разных (405, 488, 532, 635 нм) лазеров и пространственной фильтрации излучения. При использовании сканирующей микроскопии ближнего поля (СМБП) достигается высокая разрешающая способность. Наименьший размер элемента, полученного с помощью СМБП, составляет 20 нм при длине волны света 486 нм. Общее увеличение микроскопа составляет 1500х.

Компьютерная интерференционная микроскопия позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур; во многих случаях применяется для изучения живых клеток. Принцип действия автоматизированного интерференционного микроскопа основан на интерференции световых пучков лазерного излучения, отраженного от опорного зеркала и зеркала, на котором помещен измеряемый фазовый объект. Теоретически предельно достижимая разрешающая способность может составить в среднем 0,2 нм, практически она составляет 0,4 мкм.

Электронная микроскопия позволяет обнаружить объекты, которые не разрешаются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Теоретически **разрешение просвечивающего электронного микроскопа** составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных электронных микроскопов приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм.

В современных электронных микроскопах на экране достигается увеличение 5 000–200 000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих бактерию и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект получил название *негативного контрастирования*.

Выделяют два основных вида электронных микроскопов: просвечивающие (ПЭМ) и сканирующие (СЭМ).

В *просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе* электронный пучок проходит через ультратонкий образец так, что часть электронов рассеивается на образце, а часть – нет.

В *сканирующем электронном микроскопе (растровая электронная микроскопия (РЭМ))* пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое формирует изображение на светящемся экране. Для РЭМ характерны высокая разрешающая способность, большой диапазон увеличений (до 100 000 и выше), большая глубина фокусировки (~100 мкм), многообразие режимов работы. Сканирующий микроскоп дает картину поверхностей и позволяет получать трехмерное изображение.

2.2 Устройство светлопольного микроскопа

Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов.

Подобные микроскопы позволяют определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также способность микроорганизмов к дифференцирующему окрашиванию.

Успех наблюдения объекта и надежность получаемых результатов зависят от хорошего знания оптической системы микроскопа.

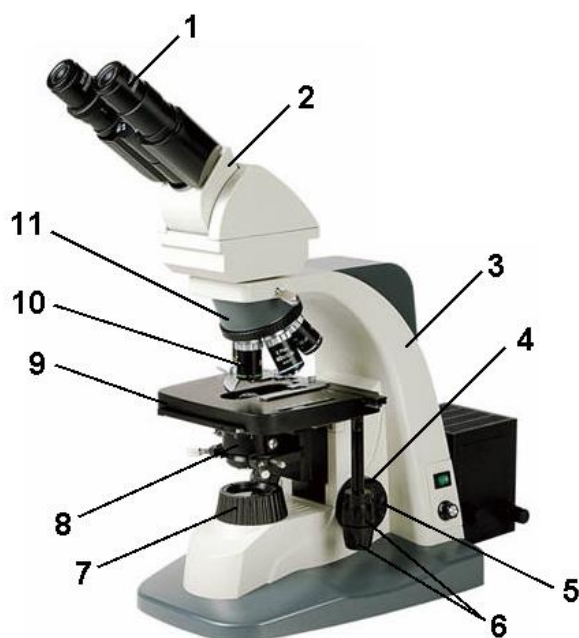
Рассмотрим устройство и внешний вид биологического микроскопа, работу его составных частей. Микроскоп имеет механическую и оптическую части (рисунок 2.1).

Механическая часть биологического микроскопа включает штатив с предметным столиком; бинокулярную насадку; рукоятку грубой настройки на резкость; рукоятку точной настройки на резкость; рукоятки перемещения предметного столика вправо/влево, вперед/назад; револьверное устройство.

Оптическая часть микроскопа включает осветительный аппарат, конденсор, объективы и окуляры.

Описание и работа составных частей микроскопа

Объективы. Объективы (тип ахроматы), входящие в комплект микроскопа, рассчитаны на механическую длину тубуса микроскопа 160 мм, линейное поле зрения в плоскости изображения 18 мм и толщину покровного стекла 0,17 мм. На корпусе каждого объектива нанесено линейное увеличение, например, 4х; 10х; 40х; 100х и, соответственно, указана числовая апертура 0,10; 0,25; 0,65; 1,25, а также цветовая маркировка.



Составные части микроскопа:

- 1 – окуляры;
- 2 – бинокулярная насадка;
- 3 – штатив;
- 4 – рукоятка грубой; настройки на резкость;
- 5 – рукоятка точной; настройки на резкость;
- 6 – рукоятки перемещения предметного столика вправо/влево (вперед/назад);
- 7 – коллектор;
- 8 – конденсор;
- 9 – предметный столик;
- 10 – объективы;
- 11 – револьверное устройство

Рисунок 2.1 – Устройство и внешний вид микроскопа

Бинокулярная насадка. Бинокулярная насадка обеспечивает визуальное наблюдение изображения объекта; устанавливается в гнездо штатива и закрепляется винтом.

Установка расстояния между осями окуляров в соответствии с глазной базой наблюдателя осуществляется разворотом корпусов с окулярными тубусами в диапазоне от 55 до 75 мм.

Окуляры. В комплект микроскопа входят два широкоугольных окуляра с увеличением 10х либо 20х.

Револьверное устройство. Четырехгнездное револьверное устройство обеспечивает установку объективов в рабочее положение. Смена объективов производится вращением рифленого кольца револьверного устройства до фиксированного положения.

Конденсор. В комплект микроскопа входит конденсор светлого поля Аббе с ирисовой диафрагмой и фильтром, числовая апертура $A = 1,25$. Конденсор устанавливается в кронштейн под предметным столиком микроскопа и закрепляется винтом. В конденсоре светлого поля имеется ирисовая апертурная диафрагма и откидная оправа для установки светофильтра.

Осветительное устройство. Для получения равномерно освещенного изображения объектов в микроскопе имеется осветительное светодиодное устройство. Включение осветителя осуществляется с помощью выключателя, расположенного на задней поверхности основания микроскопа. Вращая диск регулировки накала лампы, расположенный на боковой поверхности основания микроскопа слева от наблюдателя, можно изменять яркость освещения.

Фокусировочный механизм. Фокусировочный механизм расположен в штативе микроскопа. Фокусирование на объект производится перемещением по высоте предметного столика вращением рукояток, расположенных по обеим сторонам штатива. Грубое перемещение осуществляется рукояткой большего размера, точное перемещение – рукояткой меньшего размера.

Предметный столик. Предметный столик обеспечивает перемещение объекта в горизонтальной плоскости. Диапазон перемещения столика равен 70 x 30 мм. Объект крепится на поверхности столика между держателем и прижимом препаратопроводителя, для чего прижим отводится в сторону.

Работа с микроскопом

Перед началом работы с препаратами необходимо правильно настроить освещение. Это позволяет добиться максимального разрешения и качества изображения микроскопа.

Для работы с микроскопом следует отрегулировать раскрытие окуляров таким образом, чтобы два изображения слились в одно. Кольцо диоптрийной коррекции на правом окуляре следует установить «на ноль», если острота зрения обоих глаз одинакова. В противном случае необходимо выполнить общую наводку на резкость, после чего закрыть левый глаз и добиться максимальной резкости для правого, вращая кольцо коррекции.

Исследование препарата рекомендуется начинать с объектива наименьшего увеличения, который используется в качестве поискового при выборе участка для более подробного изучения, затем можно переходить к работе с более сильными объективами.

Убедитесь в том, что объектив 4х готов к работе. Это поможет вам установить предметное стекло на место, а также разместить объект для исследования. Поместите предметное стекло на предметный столик и осторожно зажмите его при помощи пружинных держателей.

Подсоедините сетевой шнур и включите микроскоп.

Всегда начинайте исследование с объективом 4х. Для достижения четкости и резкости изображения исследуемого объекта используйте рукоятки грубой и точной фокусировки. Если при помощи слабого объектива 4х было получено желаемое изображение, поверните револьверное устройство на следующее большее значение 10х. Револьвер должен зафиксироваться в нужном положении.

Наблюдая за объектом в окуляр, поверните рукоятку (большого диаметра) грубой фокусировки. Чтобы получить наиболее четкое изображение используйте рукоятку (маленького диаметра) четкой фокусировки.

Чтобы контролировать поток света, проходящего через конденсор, можно открыть или закрыть ирисовую диафрагму, расположенную под предметным столиком. Изменяя настройки, можно добиться наиболее четкого изображения исследуемого объекта.

Во время фокусировки не следует допускать соприкосновения объектива с объектом исследования. При увеличении объектива до 100х, объектив располагается очень близко к предметному стеклу.

Правила обращения и ухода за световым микроскопом

1 Хранить микроскоп в шкафу или под чехлом для предотвращения запыления линз окуляра, объективов, конденсора и других частей микроскопа.

2 Переносить микроскоп двумя руками, держа за штатив и основание. Во избежание нарушения юстировки необходимо предохранять микроскоп от толчков, ударов и повреждений.

3 Для сохранения внешнего вида микроскопа, его необходимо периодически протирать мягкой салфеткой, слегка пропитанной бескислотным вазелином, предварительно удалив пыль, а затем вытирать сухой мягкой чистой салфеткой.

4 Металлические детали микроскопа необходимо содержать в чистоте. Для чистки микроскопа следует использовать специальные смазочные некоррозирующие жидкости.

5 Очищать линзы от пыли хлопчатобумажной тканью, не оставляющей волосков. Иммерсионное масло удалять с линз объектива салфеткой, смоченной бензином, ксилолом или толуолом. Недопустимо при этом использовать эфир, ацетон и спирт, которые растворяют клей между линзами и нарушают качество изображения.

6 Для предохранения оптических деталей визуальной насадки от пыли необходимо оставлять окуляры в окулярных тубусах.

7 Нельзя касаться пальцами поверхностей оптических деталей. В случае, если на линзу объектива попала пыль, ее следует удалить при помощи вентилятора или кисточки. В случае, если пыль проникла внутрь объектива и на внутренних поверхностях линз образовался мутный налет, необходимо отправить объектив для чистки в оптическую мастерскую.

8 Не следует самостоятельно разбирать микроскоп и его составные для устранения неисправностей.

9 После завершения работы убирают препарат, протирают объектив, револьвер устанавливают в нейтральное положение, тубус и конденсор опускают, микроскоп помещают в шкаф или под чехол.

Меры безопасности

При работе с микроскопом источником опасности является электрический ток. Конструкция микроскопа исключает возможность случайного соприкосновения к токоведущим частям, находящимся под напряжением. Не рекомендуется оставлять включенный в сеть микроскоп без присмотра. После окончания работы микроскоп необходимо отключать от сети.

2.3 Правила работы с иммерсионным объективом

При работе с масляным иммерсионным объективом следует соблюдать определенные правила.

Для проведения исследования при помощи объектива 90х (100х) все образцы следует закрывать покровными стеклами. На сухой фиксированный окрашенный препарат наносят каплю иммерсионного масла. Устанавливают объектив 90х (100х) и, глядя сбоку, осторожно поднимают предметный столик микроскопа до погружения линзы объектива в масло. Следят за тем, чтобы фронтальная линза объектива не коснулась покровного стекла. Затем, наблюдая в окуляр, макровинтом медленно опускают предметный столик и фокусируют объектив.

Тонкую фокусировку осуществляют с помощью микрометрического винта.

По окончании микроскопирования опускают предметный столик, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой или фильтровальной бумагой, а затем салфеткой, слегка смоченной очищенным бензином. Нельзя оставлять масло на поверхности линзы, так как на нем фокусируется пыль, что может со временем привести к повреждению оптики объектива. 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.

2.4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов

Нативные (прижизненные) препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространенными являются методы «висячей капли», «раздавленной капли», «отпечаток», «агаровая пленка», микрокамеры с плотными средами. Препараты живых клеток обычно рассматривают с «сухими» системами микроскопа. Для прижизненного изучения бактерий часто используют фазово-контрастную и темнопольную микроскопию.

Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды, помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размещивают и накрывают покровным стеклом. Для этого покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее. Микроорганизмы, выращенные на плотной или в жидкой питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей; выращенные в жидкой среде — переносят стерильной пипеткой. Капля исследуемого материала должна быть мала, чтобы из-под покровного стекла не выступала жидкость. При ее наличии необходимо удаление фильтровальной бумагой.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей или иным способом наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с 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. При работе с бактериями этот метод используется редко.

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой растут микроорганизмы, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят 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. Препарат «отпечаток» используют часто при исследовании спороношения стрептомицетов.

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 ее по всей поверхности стекла. После застывания среды удаляют петлей 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 воды) при подсыхании пленки, затем накрывают покровным стеклом.

Выращивание микроорганизмов на предметном стекле позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами их роста и развития, изучать цикл развития, влияние на эти процессы каких-либо агентов. Выращивание микроколоний можно проводить в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом, покрытым лаком) условиях.

Агаровую пленку можно нанести на покровное стекло и приготовить препарат «висячая капля». На таком препарате можно наблюдать движение бактерий по типу скольжения. **Движение бактерий** за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя в большинстве случаев светлупольный микроскоп.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите основные задачи микроскопии.
- 2 Охарактеризуйте основные виды микроскопии.
- 3 Каково устройство светлупольного микроскопа?
- 4 Каким образом определяется общее увеличение микроскопа?

5 В чем сущность иммерсионного метода микроскопирования?

6 Охарактеризуйте способы приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов.

Практическое занятие 2

Цель: ознакомление с особенностями разных видов микроскопии, изучение устройства светлопольного микроскопа; овладение методом иммерсионного микроскопирования; ознакомление с приемами микроскопирования живых клеток микроорганизмов.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, предметные и покровные стекла, спиртовки, спички, бактериальные петли, пипетки, пинцеты, фильтровальная бумага, пенициллиновые бутылочки со стерильной водопроводной водой, ванночки, мостики, культура бактерий (например, суспензия гороха, настои мяса, рыбы, овощей и т. д.).

Ход работы

1 Ознакомиться с основными задачами микроскопии.

2 Используя материал, представленный в п. 2 данного пособия, ознакомиться с различными видами микроскопии. Выяснить их особенности по схеме таблицы 2.1, записать в рабочую тетрадь.

Таблица 2.1 – Особенности различных видов микроскопии

Виды микроскопии	Источник света, принцип получения изображения	Максимальная(-ое)		Область применения
		разрешающая способность	увеличение микроскопа	
1 Светлопольная				
2 Темнопольная				
3 Фазово-контрастная				
4 Люминесцентная				
5 Электронная				
6 Сканирующая световая				
7 Сканирующая электронная				
8 Компьютерная интерференционная				
9 Лазерная конфокальная				

3 Изучить устройство светлопольного микроскопа, используя описание в п. 3 практического пособия и рассматривая микроскоп.

4 Ознакомиться с сущностью иммерсионного метода микроскопирования, правилами его пользования.

5 Охарактеризовать светлопольный микроскоп и записать в рабочую тетрадь по схеме таблицы 2.2.

Таблица 2.2 – Устройство микроскопа биологического

Параметры, свойства	Характеристика микроскопа
Микроскоп биологический состоит из следующих двух частей	
Увеличение окуляров	
Увеличение объективов	
Увеличение микроскопа: а) минимальное; б) максимальное	
Оформление оправы иммерсионного масляного объектива	
Увеличение иммерсионного объектива	
Сущность иммерсионного метода микроскопирования	
Правила ухода за иммерсионным объективом	

6 Ознакомиться с различными приемами микроскопирования живых микроорганизмов.

7 Приготовить препараты по методу «раздавленная капля» из различных объектов: смыва фруктов, стола, рук, различных настоев, пользуясь описанием методики, изложенной в п. 5 данного пособия.

8 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Определить форму и сочетание клеток, подвижность.

9 Все наблюдения и рисунки отметить в таблице 2.3.

10 Указать в выводах степень наблюдаемого разнообразия прокариот; преимущества и недостатки использования в работе прижизненных препаратов.

Таблица 2.3 – Особенности морфологии клеток микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Состав среды, объект исследования	
Возраст культуры	
Форма клеток, их сочетание	
Подвижность	
Рисунок клеток	
Выводы:	

3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК

3.1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов.

3.2 Схематичное строение бактериальной клетки.

3.3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.

3.4 Простые и сложные методы окраски.

3.1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов

Морфологические типы бактерий, в сравнении с высшими организмами, немногочисленны. Клетки большинства бактерий имеют следующие три формы: сферическую, цилиндрическую или извитую, но существует небольшая группа мицелийобразующих форм, нитчатых бактерий и бактерий, образующих выросты. В соответствии с этим все бактерии по форме подразделяют на следующие группы.

Кокки (сферические клетки) могут быть одиночными (микрококки), парными (диплококки, например, нейссерия); тетракокки, располагающиеся по 4 в форме квадратов; пакетобразные кокки — тьюки (сарцины); располагающиеся цепочками (стрептококки); образующие бесформенные скопления в виде виноградных гроздьев (стафилококки). Диаметр клеток — 0,5–2 мкм.

Палочковидные бактерии (бациллы) — наиболее многочисленная группа, клетки представляют собой цилиндрические структуры. Размеры таких клеток сильно варьируют и могут быть от сотых долей до 5–10 мкм, чаще 1–3 мкм. Такие бактерии часто образуют пары или цепочки клеток (например, палочка сибирской язвы), но могут быть и одиночными (например, энтеробактерии).

Извитые бактерии могут быть трех типов: **вибрионы**, **спириллы** и **спирохеты**. Вибрионы — бактерии, изогнутые в виде запятой (холерный вибрион, кампилобактер); спириллы имеют несколько крупных обычно неравных завитков (возбудитель возвратного сыпного тифа); спирохеты имеют вид тонких спиралевидных клеток со множеством равных завитков и петель (возбудитель сифилиса, большая зубная спирохета, малая зубная спирохета).

Нитчатые бактерии – это цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или дисковидных клеток. Типичными представителями данных бактерий являются бактерии, окисляющие серу (роды *Beggiatoa*, *Thiotrix*).

К **мицелийобразующим** бактериям относятся истинные актиномицеты, которые имеют сильно разветвленный мицелий. У нокардий и микобактерий мицелий является временным и возникает на определенных стадиях роста. У коринеподобных бактерий клетки имеют только тенденцию к ветвлению, но при росте культуры наблюдается плеоморфизм клеток.

К **бактериям, образующим выросты**, относятся почкующиеся и стебельковые бактерии. Выросты – это выпячивания клеточного содержимого, окруженного клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной и не отделенные от клетки перегородкой. У некоторых бактерий выросты служат для размножения, у других – для прикрепления к субстрату или друг к другу.

Кроме вышеперечисленных, известны бактерии, которые не имеют клеточной стенки – **микоплазмы**. В культуре одного вида можно одновременно обнаружить сферические, эллипсоидные, грушевидные, дисковидные, разветвленные и неразветвленные нитчатые формы.

Архебактерии представляют собой группу бактерий с клеточной стенкой уникальной структуры, содержащей специфические химические соединения. Морфологически могут быть неправильной формы, сферическими, палочковидными, звездчатыми и т. д.

Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие плеоморфизмом.

Плеоморфизм – это морфологическая изменчивость клеток, в зависимости от условий имеющих вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития наблюдается изменение формы клеток. Поэтому **при микроскопировании следует указывать среду культивирования, температуру культивирования, возраст культуры.**

В среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5–3,0 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; продольные размеры некоторых клеток спирохет могут достигать 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, диаметр клеток которых составляет 0,1–0,15 мкм.

Для сравнения: размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

3.2 Схематичное строение бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ.

Как и любая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. В цитоплазме расположены: нуклеоид, рибосомы, внутриплазматические включения различной природы, могут иметься плазмиды. При впячивании цитоплазматической мембраны внутрь клетки образуются мезосомы.

Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют **протопласт**, снаружи от него расположены **поверхностные структуры**. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки (фимбрии и половые пили) и т. д. Ворсинки, и жгутики обязательно связаны с цитоплазматической мембраной.

Схематичное строение бактериальной клетки можно изобразить следующим образом (рисунок 3.1).

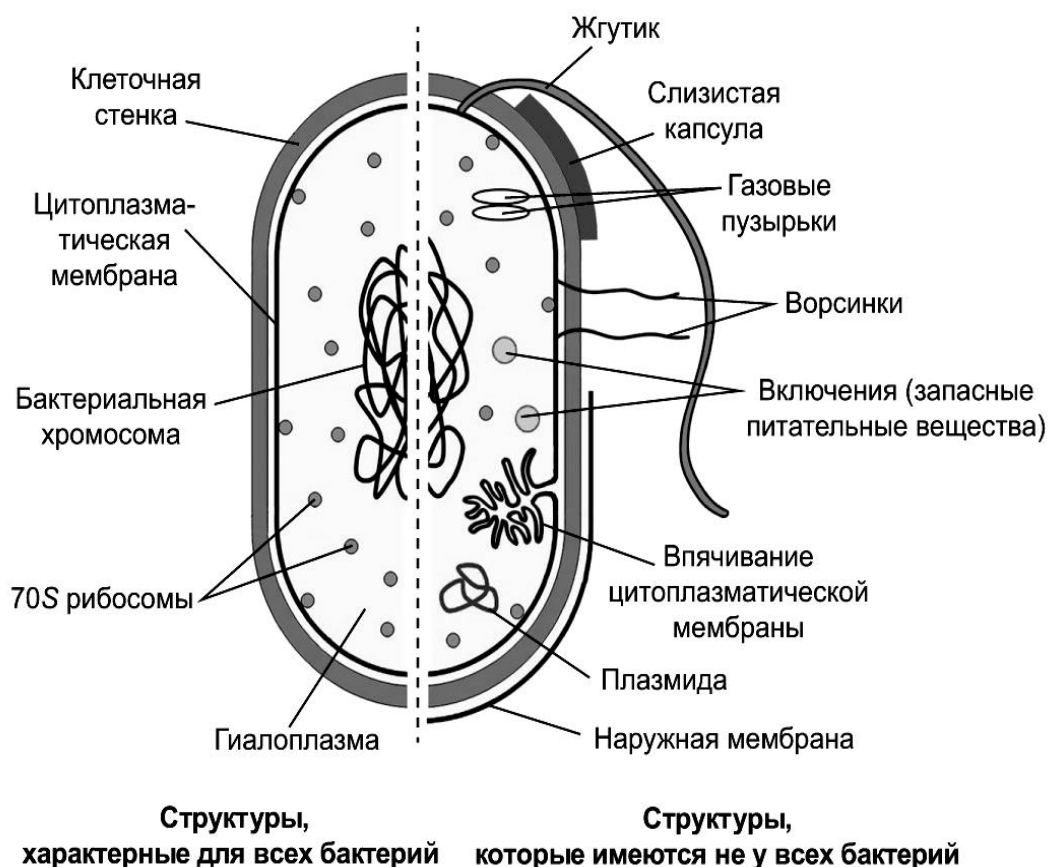


Рисунок 3.1 – Схематичное строение бактериальной клетки

По морфологии клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные.

В состав бактерий входят такие аминокислоты, углеводы, липиды и другие вещества, которые обычно не встречаются ни в клетках растений, ни в клетках животных (например, *тейхоевые кислоты*, *пептидогликан муреин*). Причем, содержание отдельных соединений существенно варьирует в зависимости от возраста бактерий, состава среды и условий культивирования.

3.3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов

Фиксированные окрашенные препараты могут храниться длительное время. Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

Окрашенные препараты бактерий готовят в соответствии со следующими этапами:

- 1) подготовка материала для микроскопирования;
- 2) приготовление мазка;
- 3) высушивание и фиксация мазка;
- 4) окрашивание фиксированного мазка;
- 5) промывание препарата водой;
- 6) высушивание препарата.

Подготовка к выполнению работы

1 Перед началом работы кювету с мостиком для окрашивания препарата размещают перед собой на столе ближе к правой руке.

2 Спиртовку располагают напротив себя на расстоянии предплечья. Проверяют наличие спирта в спиртовке, оправляют фитиль.

3 На мостик укладывают предметные стекла. **Внимание!** Стекла должны быть обезжиренными и их можно держать только за ребра. При необходимости быстро обезжирить предметное стекло можно в результате прогревания в пламени спиртовки.

4 Если предстоит брать микробный материал с плотной среды, на стекло наносят каплю водопроводной воды или физиологического раствора (изотонический раствор NaCl).

5 Зажигают спиртовку. **Внимание!** Горящую спиртовку нельзя переносить. **Техника безопасности!** Нельзя низко наклоняться над спиртовкой, чтобы не поджечь волосы.

Технология приготовления фиксированного препарата-мазка

Мазки-препараты готовят из колоний бактерий и грибов, выросших на среде в чашках Петри или на поверхности исследуемых объектов (например, плоды растений), из жидких культур, жидких сред (например, вода из природных источников, смывы с поверхностей исследуемого объекта), путем получения мазков-отпечатков. На этом этапе выполняются следующие манипуляции:

- для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки, колбы или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой. В некоторых случаях используют препаровальные или бактериальные иглы;
- делают мазки на предметных стеклах, как правило, бактериальной петлей (диаметр 2 или 4 мм) из нихромовой проволоки;
- взятый микробный материал тщательно суспензируют в капле воды или физиологического раствора на предметном стекле;
- круговыми движениями материал равномерно распределяют на площади диаметром 1,0–1,5 см. Только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей его наносят прямо на предметное стекло и готовят мазок;
- после приготовления мазка петлю стерилизуют в пламени спиртовки, сжигая при этом остатки микробного материала на петле.

Высушивание мазка проводят при комнатной температуре. Правильно приготовленные тонкие мазки имеют округлую форму, быстро высыхают при комнатной температуре. Более толстые мазки высушивают в термостате или при подогревании над пламенем спиртовки, не допуская свертывания белка бактерий и нарушения их структуры. Высушивание мазка проводят для первичного закрепления материала на стекле и для получения более качественного препарата.

Фиксация мазка чаще всего осуществляется термически (фламбированием), т. е. над пламенем горелки. Хотя данный метод фиксации и является достаточно грубым, но он сохраняет морфологию клеток и отношение бактерий к красителям. Препарат медленно проносят 2–4 раза (в течение 3–4 с) над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони вызывало легкое жжение). Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур.

Фиксация мазка преследует следующие цели: а) инактивировать микроорганизмы (они погибают); б) закрепить микроорганизмы на поверхности стекла и предотвратить их смывание водой при окрашивании; в) повысить восприимчивость клеток к красителям.

Для более детального изучения структуры клеток используют **фиксирующие растворы**, предотвращающие ферментативный автолиз бактерий и стабилизирующие макромолекулы путем химического их сшивания. Наиболее часто применяют формалин, спирты, жидкость Карнуа, ацетон и др. Мазки фиксируют, помещая препараты в раствор фиксатора на некоторое время или нанося фиксатор на мазок.

Окрашивание препаратов. Способность клеток воспринимать различные красители отражает их *тинкториальные* свойства. Это определяется структурой и составом клеточной стенки.

В основе окраски лежат сложные химические и физико-химические реакции. Протоплазма бактерий, особенно в фиксированных мазках, обладает сродством к основным красителям.

Окрашивание препаратов проводится с помощью красителей, которые можно разделить на:

- **позитивные** (метиленовый синий, фуксин и др.) и **негативные** (нигрозин, тушь). Позитивными называются красители, окрашивающие микроорганизмы, негативными – красители, заполняющие пространство, окружающее микроорганизмы, в результате чего последние становятся видимыми как силуэты на фоне красителя;

- **кислые** (эозин, кислый фуксин, конго красный) и **щелочные (основные)** (гематоксилин, азур, сафранин, основной фуксин). Кислые красители связываются с веществами, имеющими щелочную реакцию (например, цитоплазматическими белками). Щелочные – связываются с кислыми компонентами клеток (нуклеиновыми кислотами, рибосомами). Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Основные цвета окрашивания могут быть следующими: красный (основной фуксин, сафранин, конго красный); фиолетовый (генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый); синий (метиленовый синий, толудиновый синий, водный синий); зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

3.4 Простые и сложные методы окраски

Выделяют простые и сложные методы окраски.

Простыми методами окрашивания называют окрашивание препаратов каким-либо одним красителем. Некоторые микроорганизмы (спирохеты), плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко выявляются при окрашивании негативными красителями.

Техника приготовления препарата заключается в следующем. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки (мостик), которые лежат над кюветой. На мазок наносят с помощью капельницы 1 % водный раствор фуксина или метиленового синего на 1–2 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя не подсыхал. После завершения окрашивания, краситель сливают. Препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают. Для этого нижнюю сторону препарата протирают фильтровальной бумагой, а верхнюю сторону осторожно обсушивают с боков, не дотрагиваясь до мазка, в районе мазка – аккуратно промокают. Препарат окончательно досушивают на воздухе или высоко над пламенем спиртовки. Для получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой.

Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо раствора красителя заранее пропитанную им фильтровальную бумагу. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки. Микроскопируют препараты с иммерсионной системой.

При *сложных (дифференцирующих) методах* окрашивания на один и тот же препарат воздействуют несколькими красящими веществами, одно из которых называется *основным*, другие – *дополнительными*. Кроме красителей используются различные обесцвечивающие вещества: спирты, кислоты, ацетон и др. С помощью сложных методов окрашивания выявляют цитологические особенности клеток микроорганизмов (клеточные структуры, включения и т. д.).

Окраска по методу Грама является самым универсальным из сложных методов окраски. Окрашивание по Граму используется для дифференциальной окраски, исследования структуры клеточной стенки и выявления принадлежности бактерий к грамположительным или грамотрицательным группам в клинико-диагностических лабораториях и научно-исследовательской практике. Было предложено несколько модификаций оригинального окрашивания по Граму.

Окраска положена в основу дифференциации бактерий и отражает способность клеток воспринимать и удерживать внутри клетки красящий комплекс генцианового фиолетового и йода либо терять его после обработки спиртом. Соответственно выделяют грамположительные (*Bacillus, Clostridium, Streptococcus, Lactobacillus, etc.*) и грамотрицательные (*Escherichia, Pseudomonas, Erwinia, Neisseria, etc.*) формы.

Для получения достоверных результатов необходимо готовить мазки для окраски по Граму из молодых, активно растущих (обычно односуточных) культур, так как клетки из старых культур иногда дают неустойчивую реакцию по Граму. Грамотрицательные бактерии могут выглядеть как грамположительные, если бактериальная пленка (мазок) слишком толста и обесцвечивание спиртом не проведено до конца. Грамположительные бактерии могут выглядеть как грамотрицательные, если мазок переобесцвечен спиртом.

Принцип метода. Особая реакция на окрашивание связана с физическими и химическими различиями в клеточных стенках двух групп бактерий. У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тонкая, многослойная, с высоким содержанием липидов, которые легко растворяются спиртом, в результате чего в клеточной стенке образуются поры, способствующие утечке комплекса «кристаллический фиолетовый–йод», что приводит к обесцвечиванию грамотрицательных бактерий, которые при докрасивании удерживают фуксин и приобретают красный цвет. С другой стороны, клеточные стенки грамположительных бактерий толстые и состоят в основном из слоя пептидогликана муреина. При нанесении спирта происходит дегидратация, в результате чего поры клеточной стенки закрываются, удерживая комплекс «кристаллический фиолетовый–йод», и бактерии приобретают синий или фиолетовый цвет.

Этапы дифференцированного окрашивания по Граму:

1 Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги (размер 1,5х1,5 см) и на него до полного смачивания наносят карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллический фиолетовый (чаще используют модификацию Синева). Окрашивание проводят на протяжении 1–2 мин.

2 Бумажку снимают, краситель сливают и, не промывая препарат водой, наносят на препарат раствор Люголя на 1–2 мин до почернения мазка.

3 Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96° этиловым спиртом. Для этого препарат 2–3 раза помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек (время обесцвечивания – не более 30 с), либо наливают 2–4 капли спирта на мазок на 30–45 с.

4 Препарат быстро промывают дистиллированной или водопроводной водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной.

5 Мазок дополнительно окрашивают на протяжении 1–2 мин водным раствором фуксина (фуксин Пфейффера).

6 Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой (смотри: описано выше).

! Важно заливать полностью мазок каждым реактивом по очереди и тщательно удалять водой предыдущий реактив на каждом этапе.

7 Микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый (синий, пурпурный) цвет, грамотрицательные – в розовый (малиновый).

В отдельных случаях грамположительные микроорганизмы, например, спороносные палочки, приобретают грамотрицательную окраску, тогда как некоторые штаммы грамотрицательных бактерий родов *Acinetobacter* и *Moraxella* имеют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, вследствие чего выглядят как грамположительные. Для уточнения таких сомнительных результатов японский ученый Е. Куи в 1938 г. предложил КОН-тест (тест Грегерсена).

В основе этого теста лежит способность клеточных стенок грамположительных бактерий, в отличие от грамотрицательных, сохранять целостность при воздействии на них гидроксида калия.

Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов (тест Грегерсена):

1 На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой Пастера наносят каплю раствора 3 %-ного КОН.

2 Микробиологической петлей в каплю вносят анализируемую колонию (суточную твердую культуру).

3 Тщательно перемешивают колонию с раствором гидроксида калия с помощью петли (максимальная экспозиция – до 1 мин.).

4 При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, через несколько секунд жидкость в капле приобретает слизистую консистенцию, и при отрыве петли предметного стекла слизистые нити тянутся на 0,5–2,0 см. Учет результатов пробы рекомендуется проводить на темном фоне.

Приобретение грамотрицательными бактериями слизистой консистенции при обработке их гидроксидом калия связывают с выходом из клеток ДНК, представляющей собой вязкий компонент.

Нуклеоид. Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи светового микроскопа трудно. Для избирательного окрашивания нуклеоида фиксированные клетки предварительно обрабатывают разбавленной соляной кислотой, чтобы разрушить рибосомальную РНК. Последующее окрашивание основным красителем позволяет выявить нуклеоид в виде плотного тела с неправильными очертаниями, расположенного в центре или на полюсах клетки.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена отражает особенности микобактерий и нокардий.

Принцип метода. Кислотоустойчивость этих бактерий связана с высоким содержанием липидов в клеточной стенке. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются карболовым фуксином Циля при нагревании препарата в красный цвет и сохраняют эту окраску после обесцвечивания серной кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются кислотой и в последующем докрашиваются метиленовым синим в синий цвет.

Для выявления капсул пользуются различными методами, среди которых можно отметить **метод Бурри и Бурри-Гинса**. В основе метода лежит негативное контрастирование. Так как капсула микробной клетки не воспринимает красители, тушью окрашивается лишь фон микропрепарата. Капсула видна как неокрашенная зона на темном фоне тушевого мазка. По методу Бурри-Гинса тела микробных клеток дополнительно окрашиваются в красный цвет фуксином.

Для окрашивания жгутиков предложено несколько методов, общим этапом для которых является протравливание препарата (обычно растворами таннина, $KAl(SO_4)_2$, $HgCl_2$) и последующая окраска (чаще карболовым раствором фуксина). В результате этого на жгутиках происходит осаждение красителя, благодаря чему одновременно достигается как увеличение их толщины, так и уменьшение прозрачности. Одним из предложенных методов окрашивания жгутиков является **метод Лейфзона**. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки бактерий окрашиваются в красный цвет, жгутики принимают вид толстых нитей, отходящих от клетки.

Вопросы для самоконтроля

1 Перечислите основные морфологические типы клеток микроорганизмов; укажите формируемые ими типы скопления клеток.

2 Охарактеризуйте схематичное строение бактериальной клетки, отдельно сгруппировав структуры на облигатные и факультативные.

3 Перечислите этапы приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов, охарактеризуйте их.

4 Опишите принцип метода окраски по Граму.

5 Почему желательно применять фильтровальную бумагу при нанесении на фиксированный мазок карболового раствора генцианового фиолетового?

6 С какой целью можно использовать тест Грегерсена? Опишите этапы выполнения данного метода.

7 Для определения каких структур или характеристик бактериальной клетки используют методы Циля-Нильсена, Бурри-Гинса, Лейфсона?

Практическое занятие 3

Цель: ознакомление с методикой приготовления фиксированных препаратов, простыми и сложными методами окраски; ознакомление с морфологией и цитологией различных микроорганизмов.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, предметные и покровные стекла, спиртовки, бактериальные петли, стерильные пипетки, пинцеты, фильтровальная бумага, спички, маркеры, промывалки, кюветы, мостики, набор готовых растворов красок в штативе, культуры бактерий.

Ход работы

Задания на 6 баллов: выполните пункты 1, 3, 4, 7, 8, 9.

Задания на 10 баллов: выполните работу на 6 баллов, а также пункты 2, 5, 6.

1 Рассмотреть рисунок 3.1. Зарисовать схему в рабочей тетради, сделать соответствующие записи названий. Заполните таблицу 3.1

Таблица 3.1 – Структуры бактерий

Обязательные структуры	Факультативные структуры

2 Зарисовать бактерию, клетки которой при делении в нескольких плоскостях образуют неправильные по форме скопления, напоминающие гроздья винограда. Назовите тип скопления. Приведите в качестве примера виды бактерий (не менее двух), которые формируют такие скопления, и перечислите вызываемые каждым видом микроорганизмов заболевания.

3 Рассмотреть разнообразие форм прокариот на рисунке 3.2.

Описать морфологию всех представленных форм согласно схеме таблицы 3.2. Оформить таблицу в тетради.

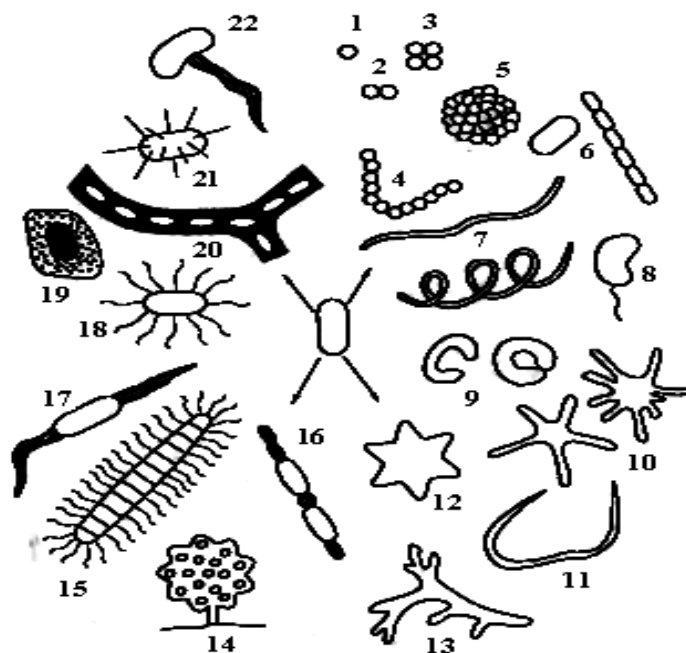


Рисунок 3.2 – Разнообразие форм прокариот

Таблица 3.2 – Морфология клеток микроорганизмов

№ п/п	Рисунок микроорганизма	Форма клетки, сочетание

4 Ознакомиться с этапами и техникой приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.

5 Охарактеризовать этапы окрашивания по Граму и результаты окрашивания, заполнив таблицу 3.3.

Таблица 3.3. – Этапы окрашивания по Граму

Краситель	Продолжительность, минуты или секунды	Результат окрашивания	
		грам-положительные	грам-отрицательные
Генциановый фиолетовый			
Раствор Люголя			
Этиловый спирт			
Фуксин основной водный (Пфейфера)			

6 Нарисовать слои мембран грамположительных и грамотрицательных бактерий, обязательно отметив плазматическую мембрану, слои пептидогликана, периплазматическое пространство и липополисахариды.

7 Приготовить фиксированный препарат по методу Грама.

8 Препараты микроскопировать с использованием биологического микроскопа с объективами 10х и 100х.

9 Охарактеризовать особенности морфологии наблюдаемых клеток микроорганизмов, согласно схеме таблицы 3.4, записать в рабочую тетрадь. Выполнить рисунки, под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 3.4 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Состав среды, объект исследования	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Окраска по Граму	
Рисунок клеток	
Выводы: указать наблюдаемое разнообразие прокариот; преимущества использования в работе фиксированных препаратов	

ЛИТЕРАТУРА

1 Быков, А. С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / А. С. Быков, А. А. Воробьев, В. В. Зверев. – М. : «МИА», 2022. – 272 с.

2 Выделение и идентификация микроорганизмов : учебно-методическое пособие / сост. Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2003. – 36 с.

3 Зверев, В. В. Микробиология : учебник / В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – 2-е изд., перераб. – М. : Бренд : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 616 с.

4 Лысак, В. В. Микробиология : учебное пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 430 с.

5 Лысак, В. В. Микробиология : методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 100 с.

6 Милехина, Н. В. Почвенная микробиология : учебно-методическое пособие для лабораторно-практических занятий / Н. В. Милехина. – Брянск : Издательство Брянской ГСХА, 2014. – 56 с.

7 Практикум по микробиологии : учебное пособие / А. И. Нетрусов [и др.]. – М. : Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.

8 Рыбальченко, О. В. Практические занятия по курсу «Микробиология, вирусология и иммунология» : учебное пособие : Ч. 1 / О. В. Рыбальченко, Е. И. Ермоленко, О. Г. Орлова ; ред. : Ю. М. Евграфова. – СПб. : СпецЛит, 2018. – 81 с.

9 Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер [и др.]. – М. : Колос, 1979. – 216 с.

10 Prescott, L. M. Microbiology : практикум по микробиологии / L. M. Prescott. – М. : Academia, 2002. – 531 с.

Производственно-практическое издание

Концевая Ирина Ильинична

**МИКРОБИОЛОГИЯ:
МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

Практическое пособие

Редактор Е. С. Балашова
Корректор В. В. Калугина

Подписано в печать 25.03.2025. Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 3,05.
Тираж 10 экз. Заказ 210.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины».
Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013 г.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий в качестве:
издателя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013 г.;
распространителя печатных изданий № 3/1452 от 17.04.2017 г.
Ул. Советская, 104, 246028, Гомель.

