

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

И. И. КОНЦЕВАЯ

**Микробиология:
морфология и структурная
организация бактериальной клетки**

**Практическое руководство
для студентов специальности 1-31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

Чернигов
Издательство «Десна Полиграф»
2017

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73
К653

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент И.В. Вуевская;
кандидат химических наук, доцент С.М. Пантелеева

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

Концевая И. И.

К653 Микробиология: морфология и структурная организация
бактериальной клетки. Практическое руководство для студ.
биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ,
Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна
Полиграф, 2017. – 44 с.

Практическое руководство 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 биологического факультета.

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73

© Концевая И. И., 2017
© УО «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины», 2017

Содержание

Введение.....	4
Занятие 1 Методы стерилизации. Подержание (хранение) культур микроорганизмов.....	5
Занятие 2 Микроскопические методы исследования в микробиологии: устройство микроскопа и основные приемы микроскопирования живых микроорганизмов.....	18
Занятие 3 Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и изучение морфологии клеток.....	31
Литература.....	42

Введение

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. На занятиях студенты получают знания о правилах работы с иммерсионным объективом; 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 руководства является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами микробиологии и выработке практических навыков работы с культурами микроорганизмов. Материал практического руководства делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества.

Практическое руководство адресовано студентам специальности 1–31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Занятие 1

Методы стерилизации. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов

- 1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории
- 2 Определение понятий асептика, антисептика, дезинфекция, стерилизация
- 3 Методы стерилизации
- 4 Методы контроля стерильности
- 5 Методы хранения культур микроорганизмов

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.

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 (хлорамины, 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.

3 Методы стерилизации

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

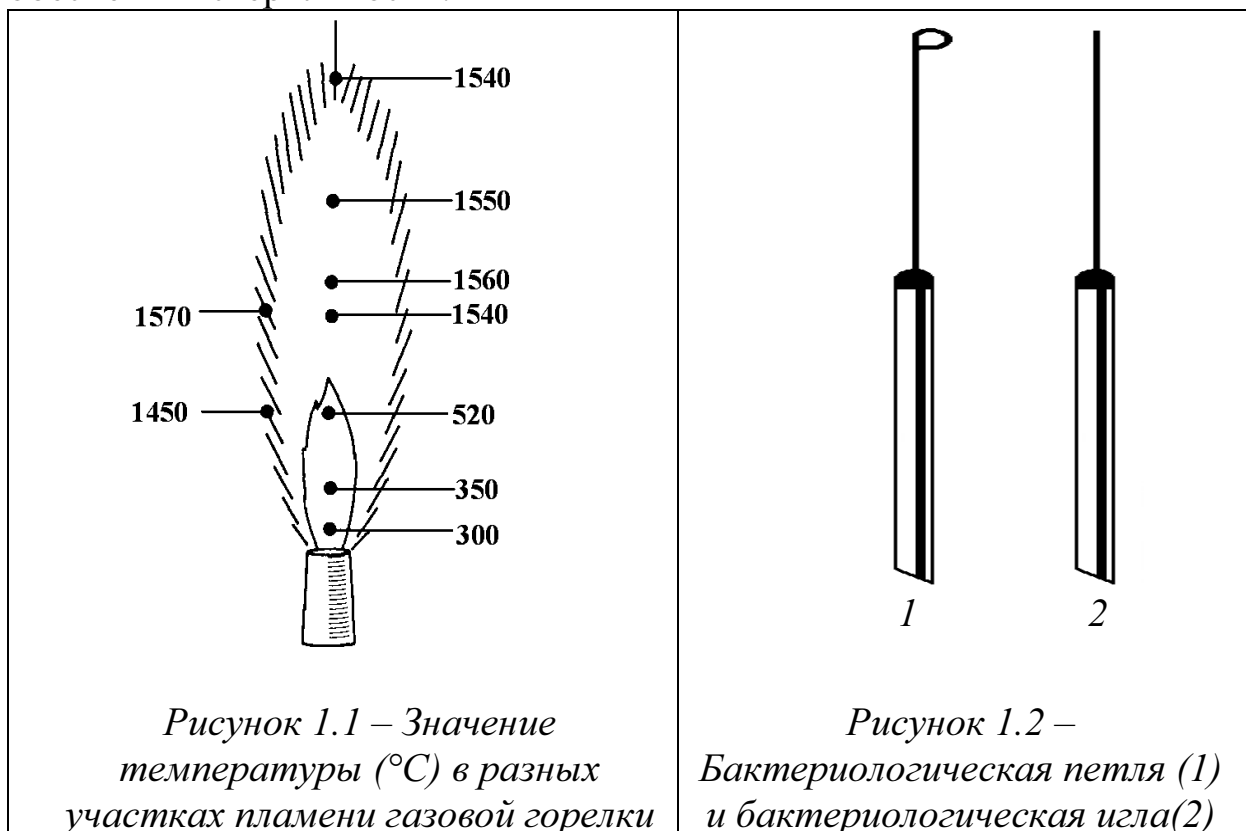
К **методам термической стерилизации (стерилизации высокой температурой)** относят: прокалывание и обжигание в пламени спиртовки; кипячение; сухожаровую (горячим паром) стерилизацию; пастеризацию; стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование); дробную стерилизацию (тиндализацию).

Прокалывание и обжигание в пламени – наиболее быстрые и доступные методы стерилизации. При прокалывании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (до 1560 °С), поэтому не следует опускать петлю низко к горелке (рисунок 1.1). При прокалывании происходит сгорание микроорганизмов и их спор. Такими методами стерилизуют бактериологические петли, иглы (рисунок 1.2), шпатели, пинцеты, предметные и покровные стекла, фарфоровые ступки и другие инструменты.

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 прокалывании петлю держат в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерна раскалена. Сразу же после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами, не допуская касания стенок сосуда.

Кипячение – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30–60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в стерилизаторах. В микробиологической практике таким способом стерилизации

пользуются редко, поскольку длительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности.



Дробная стерилизация (тиндализация или стерилизация текущим паром) используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые изменяют свойства при применении температур выше 100 °С. К таким объектам относятся витамины, некоторые среды, углеводы, молоко и т.д. Метод разработан в 1877 году Дж. Тиндалем. Согласно этому методу, жидкость доводят до 100 °С и продолжают выдерживать при этой температуре 10 мин. За это время все вегетативные клетки погибают, жизнеспособными остаются только споры. Затем жидкость охлаждают до температуры, оптимальной для прорастания спор (30 °С) и через несколько часов снова пропускают пар. Двух–трех подобных циклов обычно бывает достаточно для уничтожения всех имеющихся спор. При тиндализации резервуар с кипящей водой расположен в нижней части аппарата, над ним расположена сетка с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами.

Сухожаровая стерилизация или стерилизация сухим горячим воздухом проводится в сушильных шкафах, в частности, марки ШС-80-01 СПУ (смотрите руководство по эксплуатации). Режим стерилизации: 160–170 °С на протяжении 2 часов. При этом предполагается, что погибают как клетки, так и споры. Таким способом стерилизуют стеклянную посуду, инструменты и др., завернутые в

бумагу или закрытые ватно-марлевыми пробками для сохранения стерильности после стерилизации (таблица 1.1). Таким способом можно стерилизовать минеральные и растительные масла, жиры, вазелин, воск.

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

<i>Температура, °С</i>	<i>Время, мин</i>
<i>140</i>	<i>180</i>
<i>150</i>	<i>150</i>
<i>160</i>	<i>120</i>
<i>170</i>	<i>60</i>

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 на водяной бане либо в ультратермостате 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 как высокой температуры, так 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, например, модель ЛАС-3010/Е** (смотрите инструкцию по эксплуатации). 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, инструменты, 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.

Дезинфицирующие 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. Например, спирты используются в концентрации 60–70 % и эффективны в отношении вегетативных клеток. Фенольные соединения применяются для дезинфекции помещений.

Среди используемых летучих стерилизующих веществ можно назвать окись этилена, озон, метилбромид, формальдегид. Указанные вещества могут применяться для стерилизации пластмассовых центрифужных пробирок, пластмассовых чашек Петри, сыворотки крови и др.

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

Существуют два основных **типа фильтров – глубинные и мембранные**. Глубинные состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру и захват ими частиц определяется размером пор. Фильтры содержат различные природные (коалин, асбест, целлюлоза) или синтетические (производные целлюлозы) материалы. Различают фильтры: мембранные, получаемые на основе нитроцеллюлозы; асбестовые или фильтры Зейтца, получаемые на основе смеси асбеста и целлюлозы; фарфоровые или свечи Шамберлана, получаемые из смеси кварцевого песка и коалина, сплавленные между собой; стеклянные, полученные из стекла «Пирекс».

Перед употреблением фильтрующее устройство должно быть простерилизовано. Стерилизуют либо длительным кипячением либо

автоклавированием. Прибор собирают в асептических условиях непосредственно перед работой. Фильтры Зейтца автоклавируют в собранном виде, предварительно завернув в бумагу.

Стерилизация с использованием облучения пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые (УФ) лучи (250–270 нм) используются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток и т.д. Время облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. 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 или другими защитными оболочками.

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

Рентгеновское и γ -облучение также эффективно для стерилизации пластмасс, пищевых продуктов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. 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 больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, стероидов, пластмассового разового оборудования, шовного и перевязочного материала.

Необходим контроль остаточной радиации изделий. Основные преимущества лучевой стерилизации: возможность обработки термолабильных материалов, стерилизации объектов в упакованном виде, включение стерилизации в непрерывный производственный процесс.

Следует отметить, что все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

4 Методы контроля стерильности

Отмечено появление и распространение патогенных микроорганизмов, высокорезистентных к действию факторов окружающей среды. Поэтому ужесточаются способы стерилизации и особое значение придается правильному выбору режима стерилизации и тщательному контролю ее качества.

На практике проводят контроль стерилизации, при котором о работе стерилизующих агентов и аппаратов судят по: 1) эффективности гибели

спор в процессе стерилизации (биотест); 2) с помощью химических индикаторов; 3) прямым измерением температуры.

В качестве биотестов используют ампулы с лиофилизированной культурой *Bacillus stearothermophilus*.

Для контроля режима стерилизации существуют и разрабатываются новые диагностикумы. Примером такого диагностикума могут служить суспензии спор термоустойчивого микроорганизма в питательной среде, содержащей рН-индикатор, который служит для определения метаболической активности культуры.

В качестве физических методов используют вещества, имеющие определенную точку плавления, например, бензоафтол – температура плавления 110 °С, резорцин и серу – 119 °С, бензойную кислоту – 120 °С. При испытании одно из названных веществ помещают в трубку, размером 0,5 x 6 см, запаивают с одного конца, прибавляют немного сухого анилинового красителя (фуксин, сафранин, малахитовый зеленый) и запаивают. Несколько таких трубок помещают в автоклав между стерилизуемыми предметами. Если температура в автоклаве достаточно высока, вещество расплавится и в результате окрасится в цвет, соответствующий взятому красителю.

5 Методы поддержания (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) и заключается он в пересевах культур на свежие питательные среды один–два раза в месяц. Между пересевами микроорганизмы хранят в темноте при температурах 5–20 °С. Удобно использовать в работе **холодильник бытовой**. При использовании 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, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов.

Хранение под минеральным маслом заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла (0,5–1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов и предохраняет поверхность среды от высыхания. Такие культуры хранят в холодильнике. Большинство сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение 8–14 лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересевают через 2–3 года.

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

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 стерильной почве, песке, глине, 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, или высушивание из жидкого состояния: 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 заключается в удалении воды из замороженных суспензий под вакуумом, т. е. при этом вода испаряется, минуя жидкую фазу.

Этот метод считается одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения микроорганизмов. При его использовании многие разнородные группы бактерий и бактериофагов сохраняются в жизнеспособном состоянии 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. 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. Лучшее восстановление свойств происходит на богатых натуральных средах.

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах используется в тех случаях, когда культуры не выдерживают лиофилизации (спирохеты, микоплазмы, различные вирусы). Микроорганизмы замораживают либо в рефрижераторах (от – 12 °С до – 80 °С) либо используют рефрижераторы с азотом (от – 150 °С 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.

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

Таблица 1.2 – Время выживания бактерий при различных методах хранения

Род бактерий	Частота пересевов, 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>Neisseria</i>	1	1	–	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 Каким образом выполняется обжигание бактериологической петли?
- 5 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 шпателя, пробирка со спиртом, колбы и пробирки с ватными пробками, чашки Петри, предметные стекла, пипетки, вата, полоски бумаги, бумага, держатели, спиртовки, спички.

Ход работы

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

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

3 Ознакомиться с методами стерилизации; используемом при этом оборудовании: шкаф сушильный ШС-80-01 СПУ (смотрите паспорт), паровой стерилизатор (модель LAC-3010/E) (см. инструкцию по эксплуатации).

4 Подготовить к стерилизации сухим жаром: чашки Петри (по 3 шт. в пачке); пипетки; пробирки. Посуду и инструменты простерилизовать в шкафу сушильном ШС-80-01 СПУ при 165–170 °С в течение 3 ч.

5 Приготовить ватно-марлевые пробки для нескольких пробирок и колб разного размера.

6 Отработать приемы прокалывания и обжигания в пламени инструментов (бактериальные петли, шпателя, ножницы, пинцеты).

7 Отработать приемы прокалывания и обжигания в пламени предметных стекол.

8 Охарактеризовать способы стерилизации согласно схеме таблицы 1.3. Записать в рабочую тетрадь.

Таблица 1.3 – Способы стерилизации материала

<i>№ n/n</i>	<i>Стерилизуемый материал</i>	<i>Метод стери- лизации</i>	<i>Примечание (в каком виде, сосудах)</i>
1	<i>Питательные жидкие среды, не содержащие сахара, разлагающихся при 120 °С и выше</i>		
2	<i>Питательные плотные среды, содержащие сахара, разлагающихся при 120 °С</i>		
3	<i>Сыпучие среды (жмых, отруби, зерно)</i>		
4	<i>Растворы витаминов, антибиотиков</i>		
5	<i>Молоко, соки, сиропы, пиво, вино</i>		
6	<i>Чашки Петри (стеклянные), пипетки, шпателя</i>		
7	<i>Чашки Петри из термолабильной пластмассы</i>		
8	<i>Наконечники из термостойкой пластмассы</i>		
9	<i>Вазелиновое масло, глицерин, тальк</i>		
10	<i>Растительный материал (корни, плоды и др.)</i>		

9 Используя сведения п. 5 настоящего практического пособия и данные таблицы 1.2, заполнить таблицу 1.4.

Таблица 1.4 – Преимущества и недостатки различных методов хранения культур микроорганизмов

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

Занятие 2

Микроскопические методы исследования в микробиологии: устройство микроскопа и основные приемы микроскопирования живых микроорганизмов

- 1 Особенности разных видов микроскопии
- 2 Устройство светлопольного микроскопа
- 3 Правила работы с иммерсионным объективом
- 4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов

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 отдельно. 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 кедрового (иммерсионного) масла ($n = 1,5$). Для каждой из указанных выше жидкостей выпускаются специальные объективы, которые называются иммерсионными.

Световая микроскопия включает обычную *просвечивающую микроскопию (светло-, темнопольную), фазово-контрастную, люминесцентную*. В последнее время разработаны и другие способы микроскопии и микроскопы – *инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия*.

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете в светлом поле. 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 1500х.

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).

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Такое освещение препарата достигается использованием специального темнопольного конденсора. Темнопольная микроскопия является очень простым, но эффективным методом и хорошо подходит для получения изображения живых и неокрашенных биологических образцов. Учитывая простоту установки, качество получаемых изображений весьма хорошее.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, что находится за пределами разрешающей способности обычного светопольного микроскопа. Однако наблюдение за объектами в темном поле позволяет исследовать только контуры клеток и не дает возможности рассмотреть их внутреннюю структуру.

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 0,1 мкм.

Клетки микроорганизмов обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, примулин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500–1:100 000. Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность 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 позволяет использовать данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток и т. д.

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.

Короткая длина волны электронов позволяет различить объекты размером 0,5–1,0 нм. В современных электронных микроскопах на экране достигается увеличение 5000– 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**.

Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют **просвечивающим (или трансмиссионным)**.

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.

Лазерная конфокальная микроскопия 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 0,486 нм. В изображении контролируемого элемента отсутствуют дифракционные или интерференционные эффекты, затрудняющие определение его границ. Отличительной особенностью СМБП по сравнению с атомно-силовым микроскопом является чувствительность к оптическим характеристикам поверхности контролируемого образца, длине волны света, люминесценции и др.

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.

Рентгеновская компьютерная томография (РКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) позволяют наблюдать объекты в обычных условиях.

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, модель XSP-136 (Ningbo teaching instrument Co., LTD), 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.

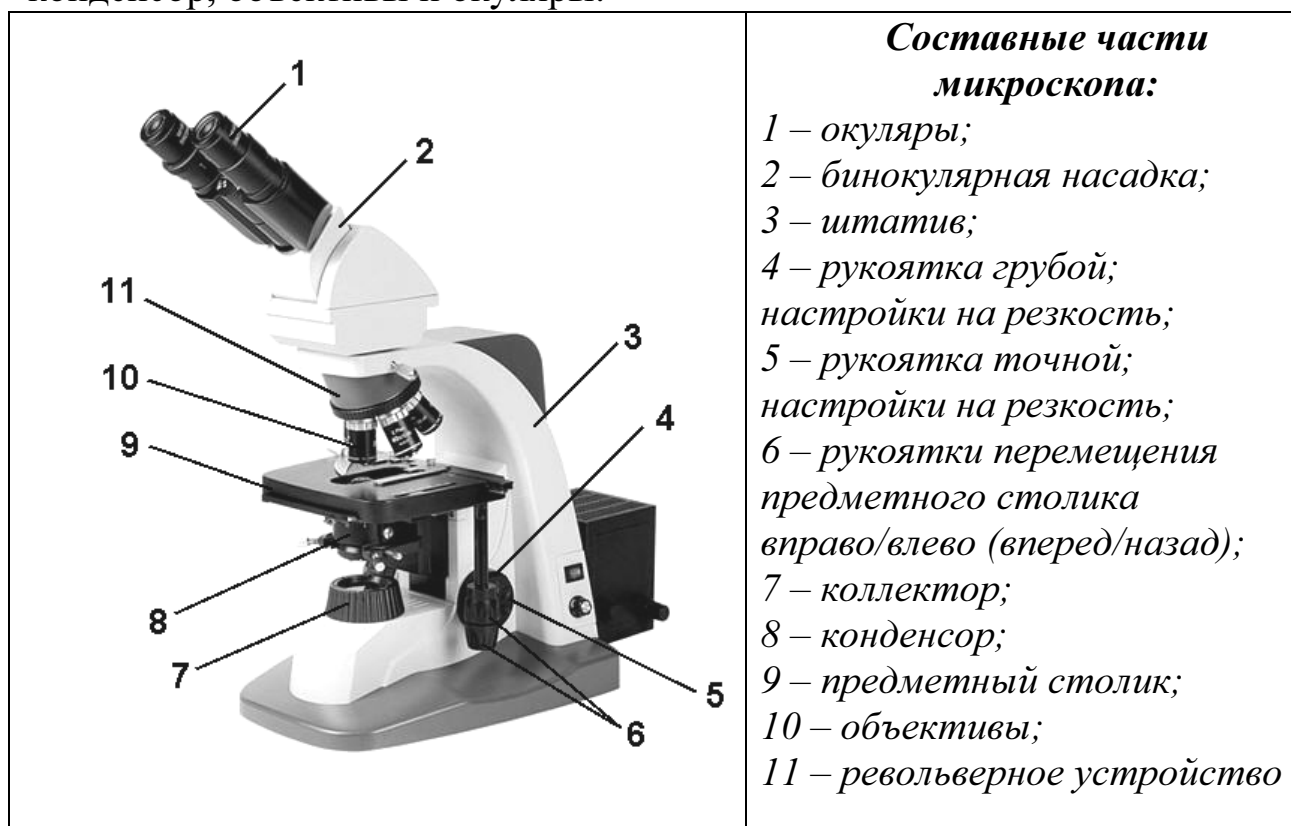


Рисунок 2.1 – Устройство и внешний вид микроскопа

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, 4x; 10x; 40x; 100x и, соответственно, указана числовая апертура 0,10; 0,25; 0,65; 1,25, а также цветовая маркировка.

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 10x.

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 70x30 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 4x 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 4x. Для достижения четкости и резкости изображения исследуемого объекта используйте рукоятки грубой и точной фокусировки. Если при помощи слабого объектива 4x было получено желаемое изображение, поверните револьверное устройство на следующее большее значение 10x. 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 100x объектив располагается очень близко к предметному стеклу.

Правила обращения и ухода за микроскопом

1 Микроскоп необходимо содержать в чистоте и предохранять от повреждений.

2 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.

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

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

5 Нельзя касаться пальцами поверхностей оптических деталей. В случае если на линзу объектива попала пыль, ее следует удалить пыль 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.

6 Во избежание нарушения юстировки необходимо предохранять микроскоп от толчков и ударов.

7 Во избежание попадания пыли на внутреннюю поверхность линз микроскоп необходимо хранить под чехлом или в упаковке.

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

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.

3 Правила работы с иммерсионным объективом

При работе с масляным иммерсионным объективом следует соблюдать определенные правила. Для проведения исследования при помощи объектива 100x все образцы следует закрывать покровными стеклами. На сухой фиксированный окрашенный препарат наносят каплю иммерсионного масла. Устанавливают объектив 100x 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.

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.

Морфологическое разнообразие бактерий можно изучить при приготовлении негативного тушевого препарата, когда окрашивают суспензию тушью. В поле зрения микроскопа на общем темном фоне туши отчетливо видны неокрашенные клетки микроорганизмов различной формы, разных размеров, расположенные в разнообразных сочетаниях.

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, размешивают 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. В последнем случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы из-под покровного стекла не выступал избыток жидкости. Если он образовался, его необходимо удалить фильтровальной бумагой. Препарат можно микроскопировать с использованием иммерсионной системы.

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. 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 в основном 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 каплю воды в случае подсыхания пленки, и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Выращивание микроорганизмов непосредственно на предметном стекле позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами их роста и развития, изучать цикл развития, способ размножения (деление-почкование), влияние на эти процессы каких-либо агентов. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей микроколонии. Выращивание микроколонии можно проводить в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом, загерметизированном 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. Наиболее эффективно наблюдение за подвижностью в темнопольном микроскопе.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите основные задачи микроскопии.
- 2 Охарактеризуйте следующие виды микроскопии: светлупольная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная, электронная, сканирующая, компьютерная интерференционная.
- 3 Каково устройство светлупольного микроскопа?
- 4 Каким образом определяется общее увеличение микроскопа?
- 5 В чем сущность иммерсионного метода микроскопирования?
- 6 Каковы правила ухода за иммерсионным объективом?
- 7 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, иммерсионное масло, стерильные медицинские пипетки, пинцеты, палочки ватные гигиенические, фильтровальная бумага, пенициллиновые бутылочки со стерильной водопроводной водой, ванночки, мостики, суспензия гороха (либо настои мяса, рыбы, овощей).

Ход работы

- 1 Ознакомиться с основными задачами микроскопии.
- 2 Используя материал, представленный в п. 2 данного руководства, ознакомиться с различными видами микроскопии. Выяснить их особенности по схеме таблицы 2.1, записать в рабочую тетрадь.

Таблица 2.1 – Особенности различных видов микроскопии

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

- 3 Изучить устройство **светлопольного микроскопа, модель XSP-136 (Ningbo teaching instrument Co., LTD)**, используя описание в п. 3 методического руководства и рассматривая микроскоп.

4 Ознакомиться с сущностью иммерсионного метода микроскопирования, его преимуществом при работе с микроорганизмами, правилами пользования.

5 Охарактеризовать светлопольный микроскоп модель XSP–136 по схеме таблицы 2.2. Записать в рабочую тетрадь.

Таблица 2.2 – Устройство микроскопа биологического

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

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 руководства.

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

<i>Параметры</i>	<i>Характеристика</i>
<i>Состав среды, объект исследования</i>	
<i>Возраст культуры</i>	
<i>Форма клеток</i>	
<i>Сочетание клеток</i>	
<i>Подвижность</i>	
<i>Рисунок клеток</i>	
<i>Выводы:</i>	

Занятие 3

Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и изучение морфологии клеток

- 1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов
- 2 Схематичное строение бактериальной клетки
- 3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов
- 4 Простые и сложные методы окраски

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 (микрочкокки), парными (диплококки, например, нейссерия); тетракокки, располагающиеся по 4 в форме квадратов; пакетообразные кокки, располагающиеся «этажами» (сарцины); располагающиеся цепочками (стрептококки); образующие бесформенные скопления в виде виноградных гроздьев (стафилококки). Диаметр клеток – 0,5–2 мкм.

Палочковидные бактерии – 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 нocardий 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.

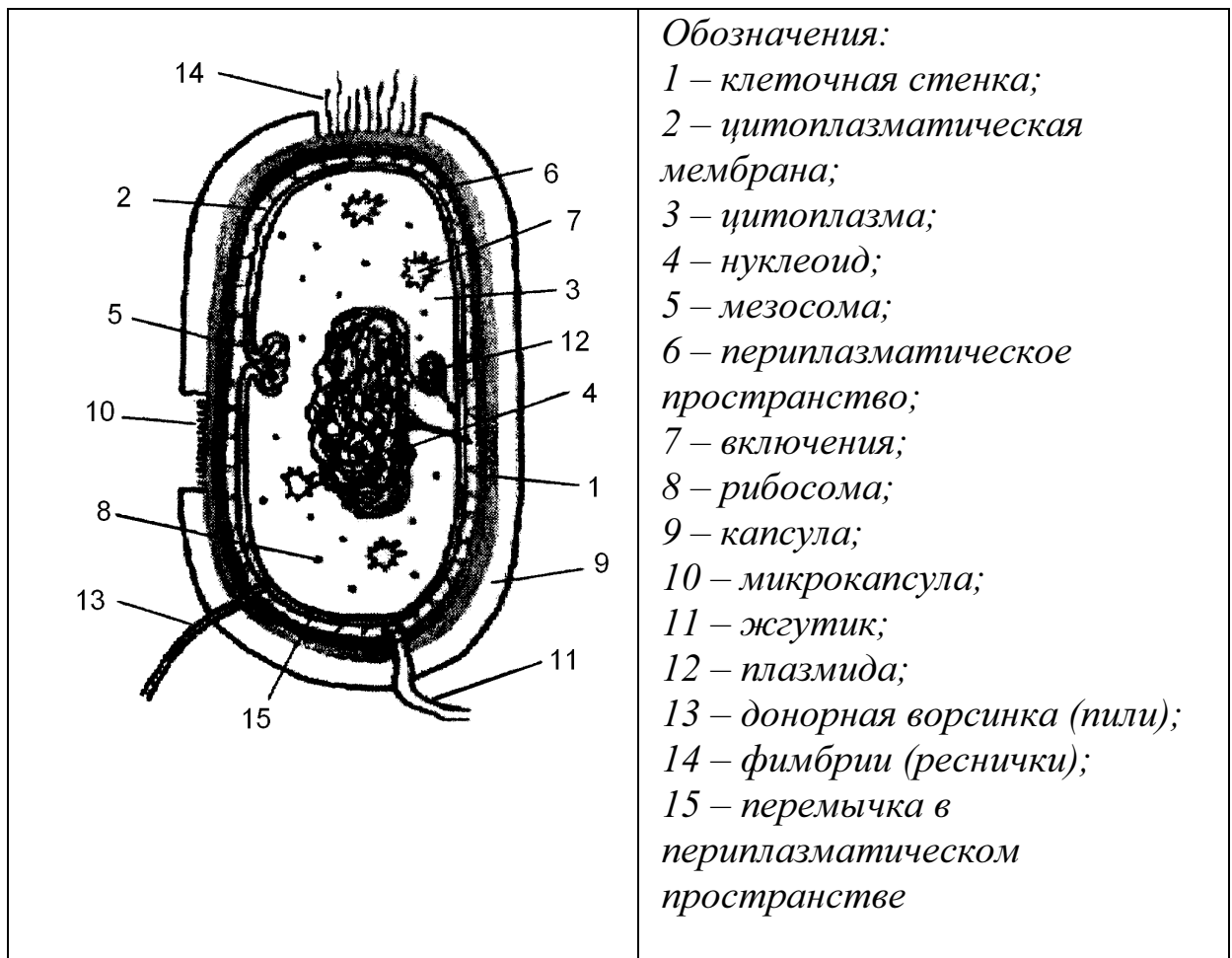
Архебактерии представляют собой группу бактерий с клеточной стенкой уникальной структуры, содержащей специфические химические соединения. Морфологически могут быть неправильной формы, сферическими, палочковидными, звездчатыми и т.д.

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. Размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

2 Схематичное строение бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рисунок 3.1). Схематичное строение бактериальной клетки можно изобразить следующим образом:



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 (фимбриии и половые пили) и т. д. Ворсинки, и жгутики обязательно связаны с цитоплазматической мембраной. 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 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. **ТБ!** 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. Хорошо 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 (флампированием), т. е. над пламенем горелки. Хотя данный метод фиксации и является достаточно грубым, но сохраняет морфологию 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 их на поверхности стекла и предотвратить их смывание при последующем 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, кислый фуксин, сафранин, конго красный); фиолетовый (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый); синий (метиленовый синий, толуидиновый синий, водный синий); зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

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 промокают фильтровальной бумагой, а верхнюю сторону осторожно обсушивают с боков, не дотрагиваясь до мазка. 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. 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.

Сущность метода. На поверхности цитоплазмы клетки у грамположительных микроорганизмов располагается комплекс из белка и рибонуклеата магния, отсутствующий у грамотрицательных бактерий. При окрашивании по Граму на поверхности грамположительных клеток образуется прочный комплекс из белка, рибонуклеата магния, генцианвиолета и йода, не разрушающийся при обработке спиртом. Такие бактерии остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают свойством удерживать краску и при обработке спиртом обесцвечиваются. Для выявления их препарат докрашивают фуксином. При этом грамотрицательные бактерии окрашиваются в красный цвет.

Этапы дифференцированного окрашивания по Граму:

1 Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги (1,5 x 1,5 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 водой (как описано выше).

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

6 Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой.

7 Микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.

Нуклеоид. Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи светового микроскопа трудно. Для избирательного окрашивания нуклеоида фиксированные клетки предварительно

обрабатывают рибонуклеазой или разбавленной соляной кислотой, чтобы разрушить рибосомальную РНК. Последующее окрашивание основным красителем позволяет выявить нуклеоид в виде плотных тел с неправильными очертаниями, расположенные 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 докрасиваются 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 или тело 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.
- 2 Охарактеризуйте схематичное строение бактериальной клетки.
- 3 Перечислите этапы приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов, охарактеризуйте их.
- 4 Охарактеризуйте сущность метода окраски по Граму.

5 Классифицируйте используемые в микробиологии красители, охарактеризуйте их.

6 Каким способом(ами) определить наличие жгутиков у бактериальных клеток?

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, иммерсионное масло, стерильные пипетки, пинцеты, фильтровальная бумага, спички, палочки ватные гигиенические, маркеры, стерильные чашки Петри, на группу – в 50 мл колбе стерильная водопроводная вода, промывалки, кюветы, мостики, набор готовых растворов красок в штативе, спирт 96⁰, пипетки, настои из натуральных материалов: мяса, гороха и т.д.

Ход работы

1 Рассмотреть разнообразие форм прокариот на рисунке 3.2. Описать морфологию всех представленных форм согласно схеме таблицы 3.1. Оформить таблицу в тетради.

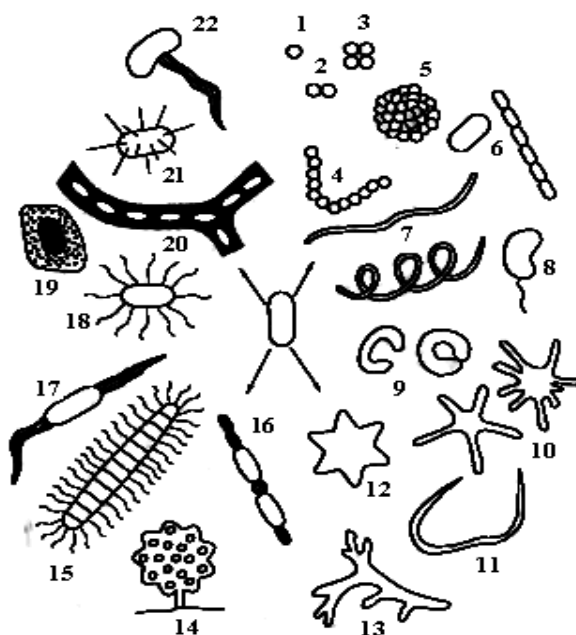


Рисунок 3.2 – Разнообразие форм прокариот

Таблица 3.1 – Морфология клеток микроорганизмов

<i>№ п/п</i>	<i>Рисунок микроорганизма</i>	<i>Форма клетки, сочетание</i>

2 Рассмотреть рисунок 3.1. Определить указанные под номерами структуры бактериальной клетки. Зарисовать схему в рабочей тетради, сделать соответствующие записи названий.

3 Ознакомиться с этапами и техникой приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.

4 Составить схему простого метода окрашивания.

5 Составить схему окрашивания препаратов по методу Грама.

6 Приготовить фиксированный препарат с использованием простых методов окраски.

7 Приготовить фиксированный препарат по методу Грама.

8 Препараты микроскопировать с использованием **биологического микроскопа, модель XSP–136**, с объективами 10х и 100х.

9 Охарактеризовать особенности морфологии клеток микроорганизмов согласно схеме таблицы 3.2, записать в рабочую тетрадь. Выполнить рисунки, под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 3.2 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

<i>Параметры</i>	<i>Характеристика</i>
<i>Состав среды, объект исследования</i>	
<i>Возраст культуры</i>	
<i>Форма клеток</i>	
<i>Сочетание клеток</i>	
<i>Окраска по Граму</i>	
<i>Рисунок клеток</i>	
<i>Выводы:</i>	

10 Указать в выводах наблюдаемое разнообразие прокариот; преимущества использования в работе фиксированных препаратов.

Литература

1 Борисов, Л. Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.

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

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

4 Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 799 с.

5 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений /А. И. Нетрусов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.

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

7 Милехина, Н.В. Почвенная микробиология: учебно-метод. пособие для лабораторно-практических занятий: для студентов агроэкологического института обучающихся по направлению 110100–Агрохимия и агропочвоведение. Классификация (степень) выпускника–бакалавр / Н.В Милехина. – Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2014 – 56 с.

Для заметок

Учебное издание

Концевая Ирина Ильинична

**Микробиология:
морфология и структурная
организация бактериальной клетки**

Практическое руководство
для студентов специальности 1–31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Технический редактор *О.Н. Ермоленко*

Подписано в печать 11.05.2017.

Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать на ризографе.

Усл. печ. л. 2,75. Усл. краск.-отт. 2,75. Уч.-изд. л. 2,56.

Тираж 15 экз. Заказ № 0080.

Отпечатано ООО «Издательство «Десна Полиграф»

Свидетельство о внесении субъекта издательского дела в Государственный реестр издателей, изготовителей и распространителей издательской продукции.

Серия ДК № 4079 от 1 июня 2011 года
14027 г. Чернигов, ул. Станиславского, 40
Тел.: (0462)972-664