

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО
Медицинский факультет
Кафедра биологии и физиологии человека

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторный практикум

Тирасполь
2021

УДК 579.23(075.8)
ББК Е46я73
М80

Составители:

В.В. Власов, канд. биол. наук, доц.

Е.Б. Бушева, ст. преп.

Рецензенты:

М.В. Капитальчук, доц. каф. ботаники и экологии ЕГФ ПГУ им. Т.Г. Шевченко

С.А. Сокова, доц. каф. биологии и физиологии человека МФ ПГУ им. Т.Г. Шевченко

Морфология микроорганизмов: лабораторный практикум / сост.: В.В. Власов, Е.Б. Бушева. – Тирасполь, 2021. – 76 с. (электронное издание)
М80 ва. Системные требования: Windows OS, HDD, 64 Mb, PDF Reader.

Лабораторный практикум посвящен актуальной проблеме изучения морфологических свойств микроорганизмов.

Предназначен для студентов 2 курса специальности 31.05.01 «Лечебное дело», изучающих учебный курс «Микробиология и вирусология», но может также представлять интерес для учителей колледжей, лицеев, гимназий, преподавателей вузов.

УДК 579.23(075.8)
ББК Е46я73

Рекомендовано Научно-методическим советом ПГУ им. Т.Г. Шевченко

© В.В. Власов, Е.Б. Бушева, составление, 2021

Оглавление

Введение	
<i>Лабораторная работа № 1. Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Микроскопический метод изучения микроорганизмов</i>	<i>6</i>
Вопросы для подготовки к тестированию на занятиях № 1 и 2	11
<i>Лабораторная работа № 2. Классификация, морфология и строение бактерий. Окраска по Граму.....</i>	<i>13</i>
Вопросы для подготовки к тестированию на занятии № 3	20
<i>Лабораторная работа № 3. Морфология и строение групп микробов. Методы обнаружения капсул бактерий</i>	<i>22</i>
Вопросы для самоподготовки к занятию 4.....	30
<i>Лабораторная работа № 4. Обнаружение эндоспор бактерий. Морфология вирусов</i>	<i>31</i>
Вопросы для самоподготовки к занятию 5.....	36
<i>Лабораторная работа № 5. Морфология и систематика грибов</i>	<i>38</i>
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 1.....	48
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 2.....	58
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 3.....	63
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 4.....	66
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 5.....	70
Список использованной литературы.....	74

Введение

Дисциплина «Микробиология и вирусология» является важной составной частью базовой подготовки студентов медицинского факультета. Микробиологические знания, умения и навыки, приобретаемые в ходе освоения данной дисциплины, несомненно понадобятся им при изучении специальных медицинских дисциплин, таких как «Инфекционные болезни» и «Эпидемиология». В связи с этим изучение общей микробиологии является важной задачей в системе подготовки студентов-медиков по указанному учебному курсу.

Исследование свойств микробов требует владения большим арсеналом методов и практических навыков, обеспечивающих сбор данных об особенностях их организации и жизнедеятельности. При этом изучение морфологических характеристик является первым, а в определенных случаях и определяющим, шагом для выяснения специфики тех или иных видов микроорганизмов разных систематических групп. Это может быть обеспечено только точным подбором и выполнением методик, разработанных для изучения их морфологии и структуры. Поэтому от обучающихся требуется овладения не только теоретическими знаниями, но и умением применять эти знания в ходе практического изучения микробов в лабораторных условиях. В связи с этим четкое, последовательное и наглядное изложение материала может оказать существенную помощь в обучении. А применение описанных методик в ходе лабораторных занятий позволит опытно удостовериться в наличии описываемых морфологических особенностей изучаемых микроорганизмов.

В настоящем учебно-методическом пособии подобраны и методически распределены лабораторные занятия по первому разделу учебного микробиологического курса – «Морфология микроорганизмов».

Пособие составлено в соответствии с учебным планом по микробиологии и позволяет осуществить выполнение всех основных видов лабораторных работ, предусмотренных учебной программой по разделу «Систематика и морфология микроорганизмов» данного курса.

Настоящая работа включает описание пяти лабораторных занятий по темам: «Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Микроскопический метод изучения микроорганизмов», «Классификация, морфология и строение бактерий. Окраска по Граму», «Морфология и строение групп микробов. Методы обнаружения капсул бактерий», «Обнаружение эндоспор бактерий. Морфология вирусов», «Морфология и систематика грибов».

Учебно-методическое пособие структурировано следующим образом: сначала представлена таблица, отражающая общее содержание лабораторной работы. После этого дается описание теоретических вопросов указанной темы, включающее несколько частей по ее ключевым вопросам, а также вспомогательные материалы в виде пояснительных таблиц, рисунков и схем. Затем следует ход практической работы, также включающий несколько частей. В них содержится информация о выполнении соответствующих методик микробиологических исследований. Здесь также имеются рисунки и таблицы, иллюстрирующие представленные методики. После этого идет перечень вопросов для подготовки к тестированию на следующем занятии.

Теоретический материал дает возможность закрепить и конкретизировать знания студентов о разнообразии, классификации, формах и строении бактерий, вирусов и микроскопических грибов. Практическая часть работы обеспечивает получение определенных навыков выполнения микробиологиче-

ских исследований, в частности приготовления микробиологических препаратов с применением различных способов окрашивания и микроскопирования с иммерсией.

После описания лабораторных работ даются листы рабочей тетради к каждой лабораторной работе. В них определены задания, которые должны выполнить студенты по ходу обучения для закрепления изучаемого материала.

В конце имеется список использованной при составлении данного пособия литературы. Эту литературу студенты могут использовать для расширения своего теоретического и практического кругозора.

Целью данного учебно-методического пособия является помощь студентам не только в изучении указанных тем, но и в приобретении опыта самостоятельной практической работы по микробиологии.

Данная работа в первую очередь предназначена для студентов 2 курса медицинского факультета университета, изучающих учебный курс «Микробиология и вирусология», преподавателей микробиологии вузов, а также может быть использована студентами биологических специальностей учебных заведений. Кроме того, она может представлять интерес для учителей колледжей, лицеев, гимназий.

Лабораторная работа № 1

Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Микроскопический метод изучения микроорганизмов

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Правила работы в микробиологической лаборатории. 2. Оснащение микробиологической лаборатории 3. Приготовление нативного препарата «раздавленная капля» смеси живых и убитых дрожжей, витальная окраска (фуксин, метиленовый синий, сафранин, бриллиантовый зеленый) 4. Приготовление мазка смеси бактерий и дрожжей, окраска простым методом. 5. Микроскопия с иммерсией.	Рис. 1 (или микрофотография) «Нативный препарат клеток дрожжевых грибов <i>Saccharomyces cerevisiae</i> » Рис. 2 (или микрофотография) «Фиксированный препарат смеси бактерий и дрожжей» Рис. 3 «Формы бактерий» (по таблице 2)	1. Таблица 1: Оборудование м/б лаборатории (сделать самостоятельно). 2. Приготовление препаратов: Мазок (окраска простым методом), нативные препараты («раздавленная капля», «висячая капля») 3. Правила работы с иммерсионным объективом. 4. Таблица 2: Виды световой микроскопии

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Правила работы в микробиологической лаборатории

При работе в микробиологической лаборатории следует неукоснительно соблюдать правила техники безопасности. В учебных лабораториях не проводятся работы с патогенными микроорганизмами, однако они могут быть случайно выделены из окружающей среды. Поэтому **любая не идентифицированная микробная культура должна рассматриваться как потенциально опасная.**

Основные правила работы представлены ниже:

1. Работайте только в спецодежде: халате, бахилах, шапочке, при необходимости – в маске.

2. Не ешьте, не пейте, не курите в лаборатории.

3. Личные вещи складывайте в специально отведенном месте.

4. На рабочих столах должны находиться только предметы, необходимые для работы.

5. Работайте в строгом соответствии с лабораторным протоколом (методикой).

6. Осторожно обращайтесь с открытым огнем. Спиртовки следует гасить только колпачком. В случае возгорания ватных пробок не дуйте на них, ограничьте к ним доступ воздуха.

7. Электрические приборы можно включать только с разрешения преподавателя.

8. Во избежание инфицирования рук работайте только бактериологической петлей и пинцетом. Использованные инструменты и предметы необходимо прожигать в пламени горелки или помещать в дезинфицирующий раствор.

9. В случае попадания капель микробной культуры на стол, его следует обработать 70 % этиловым спиртом.

10. Ненужные культуры микроорганизмов подлежат уничтожению.

11. Никакие предметы или культуры не должны покидать пределов лаборатории.

12. После окончания работ приведите рабочее место в порядок и вымойте руки.

13. Во всех непонятных ситуациях необходимо обращайтесь к преподавателю.

Часть II. Устройство микробиологической лаборатории

Микробиологическая лаборатория состоит из нескольких помещений, укомплектованных оборудованием и приборами согласно своему назначению. Все они должны хорошо проветриваться, стены и пол должны иметь отделку из легко моющихся материалов. Во всех помещениях желательно иметь бактерицидные лампы для дезинфекции воздуха.

Помещения лаборатории можно разделить на рабочие и подсобные. К рабочим помещениям относят:

1. *Микробиологический бокс*: стерильное помещение для непосредственной работы с микроорганизмами: выделения, посевов и т. д. Здесь устанавливают рабочий стол микробиолога или **ламинарный бокс** (см. рис. 1-1) – аппарат для работы с культурами микроорганизмов в ламинарном (т. е. без завихрений) потоке стерильного воздуха.

2. *Термостатная*, где установлены **термостаты** и/или **анаэроостаты** (рис. 1-2 и 1-3) – аппараты, предназначенные для выращивания (культивирования) микроорганизмов. В них поддерживается постоянная заданная температура. В анаэроостате помимо температуры устанавливается бескислородная газовая среда, подходящая для анаэробных бактерий.

3. *Комната для проведения микроскопических и биохимических исследований*. Здесь устанавливают микроскопы, центрифуги, водяную баню и другое необходимое оборудование.

К подсобным помещениям относятся:

1. *Автоклавная*. В этом помещении устанавливают **автоклав** (рис. 1-4) – аппарат для стерилизации объектов паром под давлением (чем выше давление – тем выше температура пара). В автоклаве стерилизуют большинство питательных сред, пере-

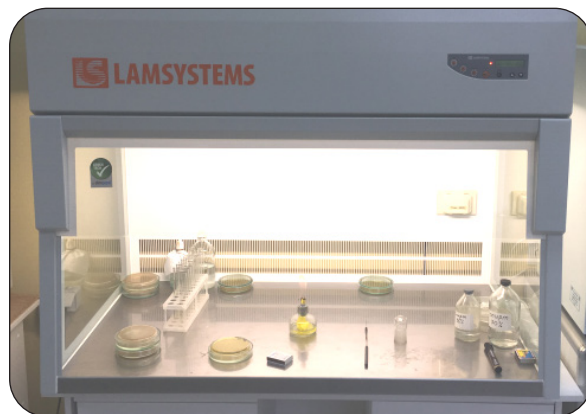


Рисунок 1-1. Ламинарный бокс



Рисунок 1-2. Лабораторные термостаты



Рисунок 1-3. Анаэроостат



Рисунок 1-4. Автоклав



Рисунок 1-5. Сухожаровой шкаф

вязочный материал, резиновые и силиконовые изделия и т. д. В этом же помещении обычно устанавливают **сухожаровой шкаф** («печь Пастера») (рис. 1-5). Сухожаровой шкаф предназначен для сушки и стерилизации посуды, инструментов и других предметов, которые могут выдерживать нагрев до 160...180 °С.

Часть III. Виды световой микроскопии

Наиболее часто применяемые в микробиологии способы световой микроскопии представлены в таблице 1-1.

Часть IV. Красители в микробиологии

Микроорганизмы – микроскопически малые живые организмы. Большинство из них не вырабатывают каких-либо пигментов: они плохо преломляют свет, т. е. они практически прозрачны. Даже в самый лучший микроскоп их рассмотреть очень трудно: нужно использовать темнопольную или фазово-контрастную микроскопию.

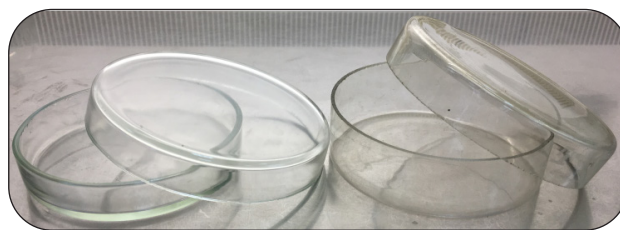


Рисунок 1-6. Чаши Петри (слева) и Коха (справа)

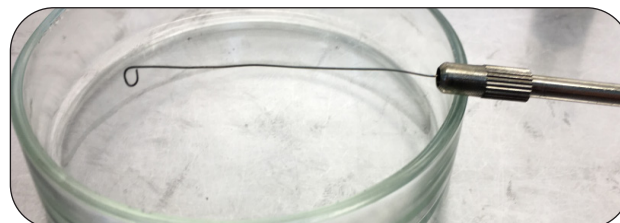


Рисунок 1-7. Микробиологическая петля

2. **Препараторская.** Здесь готовят и хранят питательные среды, растворы реактивов и т. д. Здесь находятся дистиллятор, водонагреватель, весы, плитка, холодильник и другое вспомогательное оборудование.

3. **Моечная.**

4. **Склад** для хранения посуды и реактивов.

В микробиологической лаборатории используется специальная и общелабораторная посуда и инструменты: чаши Петри, чаши Коха (рис. 1-6), биологические пробирки и колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками, микробиологические петли (рис. 1-7), пинцеты, шпатели, кюветы, лотки, предметные и покровные стёкла и другой инвентарь.

Виды световой микроскопии

Название	Сущность метода	Применение
Микроскопия с иммерсией	Применяется иммерсионный объектив, погружённый в масло, благодаря чему устраняется преломление световых лучей, идущих через объектив и достигается наилучшая видимость объекта.	Изучение живых и фиксированных окрашенных бактерий при максимальном для светового микроскопа увеличении объектива $\times 90$, $\times 100$.
Люминесцентная микроскопия	Используется люминесцентный (флуоресцентный микроскоп). Метод основан на способности свечения объектов, обработанных красителями-флуорохромами (например, акридиновый оранжевый).	Изучение живых бактерий и их структур, выявление бактерий в почве, илах и ризосфере растений, быстрая диагностика инфекционных болезней.
Фазово-контрастная микроскопия	Используется фазово-контрастное устройство, с помощью которого происходит превращение фазовых сдвигов световых лучей, проходящих через клеточные структуры разной плотности (невидимые глазом), в амплитудные контрастные (видимые глазом).	Изучение неокрашенных живых объектов. Изучение подвижности, особенностей жизнедеятельности.
Темнопольная микроскопия	Используется конденсор или объектив с затемнённым центром. Основан на явлении дифракции при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндала).	Изучение живых объектов величиной $0,02 \dots 0,06$ мкм.

годы лидером в этой области была Германия, поэтому традиционно для многих красителей используют два названия: на языке исследователя и на немецком, например:

- кристаллический фиолетовый – кристаллвиолет
- малахитовый зелёный – малахитгрюн
- конго красный – конгорот
- бромтимоловый синий – бромтимолблау и т. д.

Некоторые из синтезированных красителей затем нашли своё применение в биологии а затем и в медицине: например фуксин (в препарате фукорцин), бриллиантовый зелёный, метиленовый синий. Красная краска протонзил обладала значительной токсичностью для бактерий и была почти безвредной для человека и её стали применять для лечения многих инфекций под названием «красный стрептоцид», впоследствии активный метаболит протонзила стали выпускать как самостоятельный препарат «белый стрептоцид» или просто «стрептоцид».

Существует множество красителей и несколько систем их классификации.

Чаще всего красители разделяют на 4 группы:

I. Основные (базофильные, ядерные) красители.

Это основная группа красителей, применяемая в микробиологии. Они окрашивают базофильные структуры клеток. Базофильные структуры – это структуры клеток, содержащие много РНК и ДНК.

I-а. Основные красители

Примерами таких красителей являются *сафранин, азури, метиленовый синий, толуидиновый синий, фуксин, кристаллический фиолетовый, метиловый фиолетовый, метиловый зелёный*.

I-б. Протравные красители

Эти красители образуют яркоокрашенные лаки с ионами металлов. Примерами таких красителей являются *гематоксилин, кармин, ализарин*.

II. Кислые (цитоплазматические) красители.

С химической точки зрения большая часть этих красителей является сульфоновыми и карбоновыми кислотами, вступаю-

щими в связь с белками цитоплазмы. Примерами таких красителей являются *эозин, флюоресцеин, конго красный, нейтральный красный*

III. Нейтральные красители

В эту группу можно отнести красители, окрашивающие липиды, например *судан, нильский голубой*

IV. Флюорохромы

В эту группу входят как основные так и кислые красители, общим свойством которых является способность флуоресцировать при облучении синим, фиолетовым, ультрафиолетовым светом, например *акридиновый оранжевый, этидий бромид, пиронин G*

Влияние pH

на качество окрашивания препарата

Белковые молекулы содержат некоторое количество свободных карбоксильных и аминных групп.

Молекулы некоторых белков содержат больше свободных карбоксильных групп (COO^-), чем аминных (NH_3^+), соответственно, они имеют отрицательный заряд и проявляют **слабые кислотные свойства**. Такие белки будут лучше связываться с **основными** красителями.

Другие белки, наоборот, относительно богаче аминными группами (NH_3^+), т. е. в своем составе содержат больше остатков диаминовых аминокислот. В нейтральном растворе они ведут себя как **слабые**

основания. Такие белки лучше окрасятся **кислыми** красителями.

На свойства белковых веществ оказывает влияние концентрация водородных ионов – pH среды.

Белки относятся к амфотерным электролитам: в щелочном растворе молекулы белка заряжены отрицательно (диссоциирует как кислота), а в кислом – положительно (диссоциирует как щёлочь). При определенном pH заряд частиц становится равен нулю. Это состояние называется **изоэлектрической точкой**.

При переходе через изоэлектрическую точку при изменении pH среды заряд белковой молекулы меняется и белки могут перестать связываться с теми красителями, которые при обычных условиях придают им **ожидаемый цвет**. Это может привести к неправильной трактовке результатов окрашивания.

Помимо этого, **некоторые красители являются также и индикаторами**: например, конго красный в кислой среде меняет цвет на синий, бриллиантовый жёлтый в щелочной среде меняет цвет на красный, метиловый фиолетовый в кислой среде становится жёлтым и т. д.

Поэтому очень важным является тщательное следование лабораторному протоколу во избежание ошибок при окраске препаратов.

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Приготовление нативного препарата по типу «раздавленная капля»

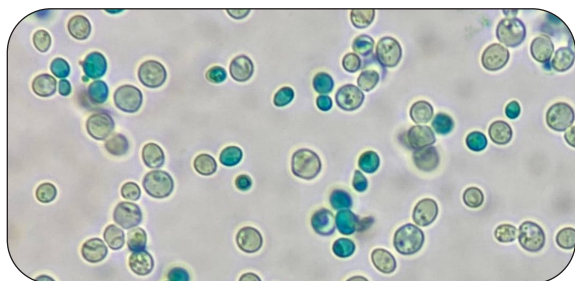


Рисунок 1-9. Препарат «раздавленная капля» живых и мёртвых клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с добавлением красителя бриллиантового зелёного. Хорошо окрашиваются только мёртвые клетки; $\times 400$

1. Приготовить суспензию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
2. Часть суспензии прокипятить
3. Нанести на предметное стекло каплю живой и каплю прокипяченной суспензии, смешать капли
4. Добавить небольшую каплю красителя (метиленовый синий или сафранин), перемешать и подождать 10...15 минут
5. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать с объективом $\times 10$ и $\times 40$
6. Сфотографировать
7. Сделать вывод об окрашивании живых и мёртвых клеток (рис. 1-9)

Часть II. Приготовление фиксированного мазка смеси бактерий и дрожжей

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура. Для фиксации мазка его осторожно нагревают над пламенем горелки или используют различные химические фиксаторы: метиловый спирт, эфир, пары формалина или осмиевой кислоты и другие вещества. Мазки фиксируют для:

а) закрепления препарата на предметном стекле (предотвратить смывание клеток при промывании препарата)

б) улучшения окрашивания (мёртвые клетки лучше воспринимают красители)

1. Приготовить суспензию бактерий *Sarcina flava* и смешать её с дрожжевой

2. Фиксировать препарат над пламенем и провести простое окрашивание метиленовым синим. Промыть водой. Просушить

3. Микроскопировать с иммерсией

4. Сфотографировать

5. Сделать выводы о размерах клеток бактерий и грибов

Правила работы

с иммерсионным объективом.

1. Поднять вверх до упора конденсор и, глядя в окуляр, при малом увеличении установить максимальную освещенность поля зрения. Если микроскоп имеет вмонтированный осветительный прибор, то включить его и отрегулировать интенсивность светового потока.

Часть III. Сравнение размеров прокариотических и эукариотических клеток

Просмотреть с иммерсией готовый постоянный препарат, подобный представленному на рисунке 1-10 и сделать вывод о раз-

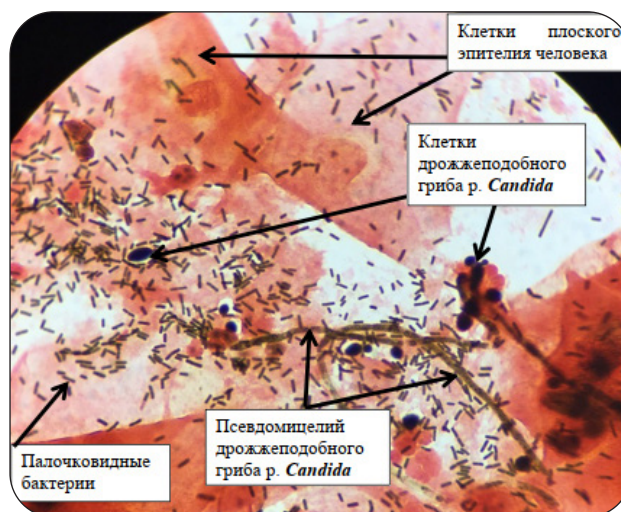


Рисунок 1-10. Клетки бактерий, грибов и человека. Окраска по Граму, $\times 1000$

2. Поместить препарат с каплей иммерсионного масла на предметный столик, револьвером установить иммерсионный объектив.

3. Глядя сбоку, макровинтом довести объектив до соприкосновения с каплей масла.

4. Глядя в окуляр, макровинтом осторожно установить нечёткое, а микровинтом – чёткое изображение объекта.

5. Провести микроскопию.

6. После микроскопии макровинтом отдалить объектив от предметного столика, препарат удалить, а объектив очистить от масла.

мерах клеток бактерий и клеток высших организмов.

Вопросы для подготовки к тестированию на занятиях № 1 и 2

1. Для каких целей служит лабораторный термостат?

2. Для каких целей служит микроанаэрогенатор?

3. Для каких целей служит центрифуга?

4. Для каких целей служит сухожаровой шкаф?

5. Для каких целей служит автоклав?

6. Для каких целей служит ламинарный бокс?

7. Для каких целей готовят нативные препараты?

8. Для каких целей готовят фиксированные препараты?

9. Опишите основные методы световой микроскопии (таблица в методичке)

10. В чем разница между простыми и сложными методами окрашивания препаратов?
11. Что такое тинкториальные свойства бактерий?
12. От чего зависит способность бактерий окрашиваться по Граму? Запишите и выучите протокол окраски
13. Для чего применяют метод окраски по Цилю-Нильсену? Чем объясняется кислотоустойчивость?
14. Для чего применяют метод окраски по методам Ожешко, Шеффера-Фултона, Пешкова?
15. Для чего применяют метод окраски по Нейссеру?
16. Для чего применяют метод окраски по методам Бурри-Гинса и Баха-Дрободько?
17. Перечислите основные морфологические типы и группы бактерий (таблица в методичке)
18. Что является основной таксономической категорией в микробиологии?
19. Какой вид таксономии признает все изучаемые признаки микроба равнозначными?
20. Какой вид таксономии микроорганизмов основан на физико-химических и биохимических методах исследований?
21. Какой вид таксономии микроорганизмов основан на изучении их геномов?
22. Какой вид таксономии микроорганизмов основан на определении антигенов, содержащихся в бактериальной клетке?
23. Что такое клон? штамм? чистая культура?
24. Опишите строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (развёрнутый ответ). Сколько слоёв различают в клеточной стенке грамположительных и грамотрицательных бактерий?
25. Что такое L-формы бактерий? Почему они возникают и чем состоит их опасность?
26. Что такое жгутики бактерий? Зачем они нужны?
27. Что такое монотрихи? лофотрихи? перитрихи?
28. Что такое фимбрии и пили? Их значение.
29. Почему бактерий называют прокариотами? Что такое нуклеоид? плазмиды?
30. В чём состоит отличие бактериальных рибосом от рибосом человека?

Лабораторная работа № 2

Классификация, морфология и строение бактерий. Окраска по Граму

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Виды световой микроскопии. 2. Классификации микроорганизмов. 3. Морфологические варианты бактерий 4. Ультраструктура бактериальной клетки. 5. Окраска по Граму.	1. мазок смеси бактерий и дрожжей, окраска по Граму, x100; 2. этапы окраски по Граму	1. План описания морфологических признаков бактерий. 2. Методика окраски по Граму. 3. Методика измерения бактерий.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Принципы классификации микроорганизмов.

В процессе эволюции живые организмы разделились на многочисленные группы, отличающиеся друг от друга по множеству признаков.

Микроорганизмы могут быть представлены:

I. Неклеточными формами:

- вирусами
- вириоидами
- прионами

II. Клеточными формами (рис. 2-1):

- бактериями
- археями
- грибами
- простейшими

Классификация микроорганизмов преследует цель распределения их по группам – **таксонам** по степени их однородности и родства.

По своей иерархии таксоны неравнозначны. Наивысшим таксоном является *домен* (надцарство), затем, по нисходящей, – *филум* (тип), *класс*, *порядок*, *семейство*, *триба*, *род* и *вид*.

Конечной целью изучения микроорганизма является отнесение его к тому или иному таксону и, как итог, установление

его видовой принадлежности – его идентификация.

В настоящее время быстрыми темпами развиваются генетические методы идентификации микроорганизмов, основанные на прямом изучении их наследственной информации, закодированной в нуклеиновых кислотах. Однако пока данных получено недостаточно и для идентификации бактерий в большинстве случаев изучают их фенотипические признаки. **Описывая фенотип бактерии, мы косвенно описываем их геном.** Важнейшими фенотипическими признаками бактерий являются:

- *морфологические* (форма клеток, их величина, взаимное расположение, подвижность, способность к образованию эндоспор или цист – табл. 2-1).

- *тинкториальные свойства* (способность окрашиваться теми или иными красителями)

- *культуральные* (характер роста на тех или иных питательных средах)

- *физиологические и биохимические* (способность усваивать те или иные вещества для роста и развития, потребность в кислороде и т. д.)

Филогенетическое древо, построенное на основании анализа 16S рРНК

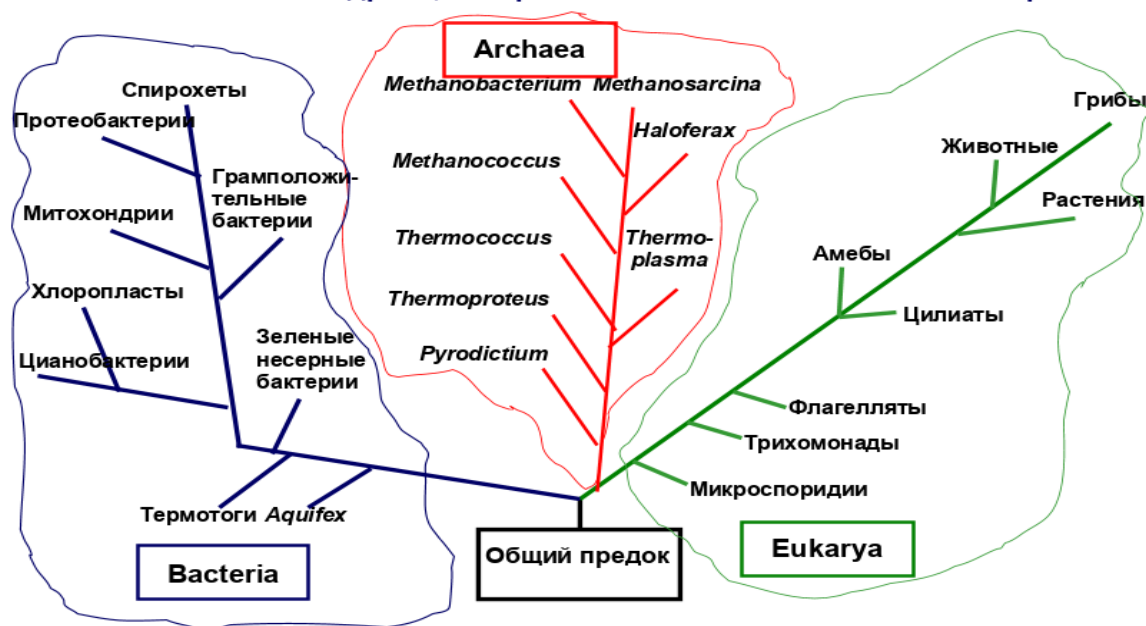


Рисунок 2-1. Современная классификация клеточных форм живых организмов на основании анализа 16S рРНК

- антигенные (наличие на поверхностных структурах микроорганизма молекул, узнаваемых иммунной системой хозяина)
- фаготипические (поражаемость определенными бактериофагами)

Как показано на рисунке 2-1, в настоящее время различают три домена клеточных форм жизни: *Bacteria* (куда входят настоящие бактерии), *Archaea* (архебактерии), *Eukarya* (эукариоты).

Часть II. Окраска по Граму

Одним из важнейших фенотипических признаков бактерий является их способность или неспособность окрашиваться по методу, предложенному Грамом.



Рисунок 2-2. Ганс Кристиан Грам

В 80-х годах XIX века датский микробиолог Ганс Кристиан Грам (рис. 2-2) работал в берлинском морге окрашивая поражённые ткани различными красителями. Ему удалось обнаружить возбудителя пневмонии, при этом видимыми становились и некоторые другие бактерии. Нахождение микроорганизмов в поражённых тканях и сейчас в целом ряде случаев является очень важным для диагностики и назначения лечения.

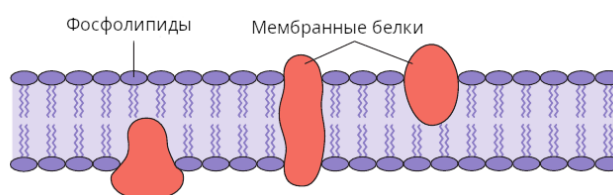
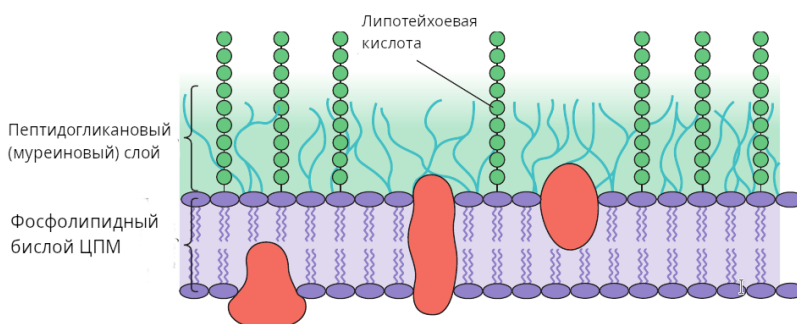
Однако, быстро стало понятно, что не все бактерии окрашиваются по методу, предложенному Г.К. Грамом. Причины этого оставались неясными вплоть до изобретения в 30-е годы XX века электронного микроскопа.

Тогда стало понятно, что способность окрашиваться или не окрашиваться по методу Грама зависит от типа строения клеточной стенки бактерий (табл. 2-1, рис. 2-2).

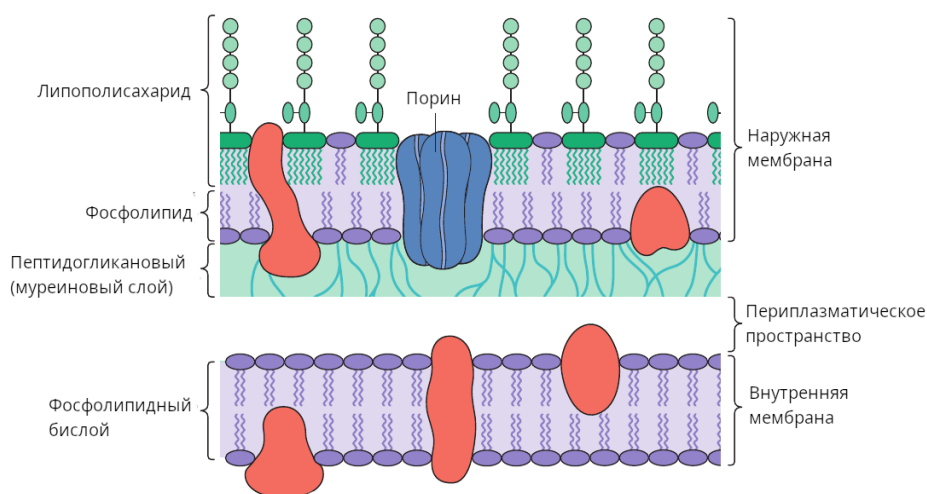
Таблица 2-1

Состав и строение клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий

Тип клеточной стенки	Толщина, сложность	Основные структурные компоненты
Грамположительный	20...80 нм простая	1. Многослойный муреин, пронизанный тейхоевыми кислотами, в верхней части стенки небольшое количество белков, полисахаридов, реже липидов
Грамотрицательный	15...20 нм сложная	1. Тонкий одно-, двуслойный муреин. 2. Слой гликопротеина. 3. Наружная мембрана, подобная ЦПМ, с ЛПС и порами, образованными триплетами белков-поринов. Между ЦПМ и клеточной стенкой – периплазматическое пространство, заполненное гелеобразным матриксом, в котором находятся различные белки, в том числе ферменты

А – простая мембрана *Mycoplasma pneumoniae*

Б – Клеточная стенка грамположительной бактерии



В – клеточная стенка грамотрицательной бактерии

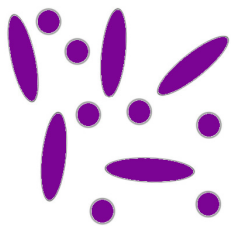
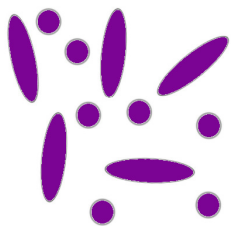
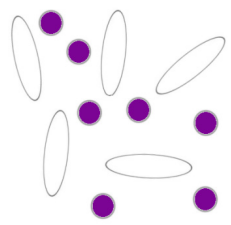
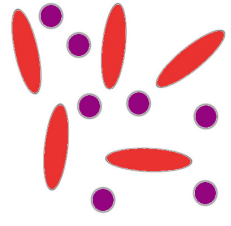
Рисунок 2-2. Строение клеточных стенок бактерий

Принцип окраски по Граму (см. табл. 2-2) заключается в следующем: клетку окрашивают каким-либо базофильным анилиновым красителем, например, кристаллическим фиолетовым, метиловым фиолетовым, бриллиантовым зеленым и т. д., затем обрабатывают раствором иода (например, раствором Люголя). В результате образуется комплекс краситель-иод, который плохо растворяется в спирте. При обработке мазка спиртом этот комплекс удаляется из стенок грамотрицательных бактерий, но удерживается в стенках грамположительных – **они остаются**

окрашенными. Для того, чтобы увидеть грамотрицательных бактерий, ставших бесцветными после обработки мазка спиртом, мазок докрасивают другим красителем, отличающимся по цвету от первого. В качестве такого красителя (*контркрасителя*) чаще используют растворы фуксина, сафранина, нейтрального красного. Таким образом грамположительные бактерии оказываются окрашенными *обоими* красителями и приобретают обычно цвет первого красителя, который маскирует второй, а грамотрицательные приобретают цвет контркрасителя.

Таблица 2-2

Принцип окраски по Граму

Этап		Вид препарата под микроскопом
I	Нанести изучаемую бактериальную культуру на предметное стекло и фиксировать мазок над пламенем горелки. Бактерии бесцветны и прозрачны, их трудно увидеть под микроскопом.	
II	На 1 минуту нанести на мазок основной краситель. Затем промыть мазок водой. На этом этапе все бактерии окрашиваются одинаково.	
III	Нанести на окрашенный мазок раствор Люголя на 1 минуту для закрепления окраски. Затем промыть мазок водой.	
IV	Промыть мазок 96 % спиртом (время обработки может отличаться в зависимости от модификации метода – от 15 до 30 секунд). При этом грамотрицательные бактерии обесцвечиваются, а грамположительные остаются окрашенными. Промыть мазок водой.	
V	Для того, чтобы увидеть грамотрицательные бактерии, на мазок наносят дополнительный краситель, затем промывают мазок водой. Грамположительные бактерии оказываются окрашенными обоими красителями и становятся фиолетовыми, а грамотрицательные оказываются окрашены только дополнительным красителем в красный цвет	

Следует иметь ввиду, что лабораторным протоколом, предложенным Грамом, сейчас никто не пользуется. Он предполагал использование генцианового фиолетового, везувина, абсолютного спирта, анилиновой воды для промывания мазков. С тех пор протокол окраски был существенно упрощён, появилось большое количество модификаций этого метода; неизменным остался только принцип его действия.

Обычно в каждой конкретной лаборатории используют метод Грама в одной из его модификаций, например, в модификации Синёва.

Знание типа клеточной стенки играет важную роль в разработке тактики лечения больных. Например, пенициллин блокирует работу фермента транспептидазы, который образует пептидные мостики между волокнами муреина, клеточная стенка дестабилизируется, и клетка погибает. У грамотрица-

тельных бактерий слой липополисахаридов препятствует действию пенициллина, а гидролитические ферменты в периплазматическом пространстве могут его разрушать, поэтому он может быть неэффективен.

Также от типа клеточной стенки зависит способность антибиотиков проникать в бактериальную клетку.

При приготовлении фиксированных мазков также проводят измерение размеров бактериальных клеток.

Для измерения используется объективный микрометр (металлическая пластинка размером с предметное стекло, имеющая по центру стеклянное «окошко», на котором нанесена линейка длиной 1 мм; линейка разделена на 100 делений с ценой деления 10 мкм) и окулярный микрометр (круглая стеклянная пластинка, в центре которой нанесена линейка длиной 5 мм, разделенная на 50 произвольных равных делений).

Часть III. Техника измерения бактерий

- Вставить окуляр-микрометр между линзами окуляра делениями вниз, вывинтив его глазную линзу.
- Поместить на предметный столик объект-микрометр и отцентрировать линейку при малом увеличении.
- Установить объектив, при котором будут просматриваться микробы.

- Совместить деления шкал обоих микрометров, рассчитать цену деления окуляр-микрометра при данной степени увеличения.
- Поместить на предметный столик препарат вместо объект-микрометра.
- Произвести измерение микробов, используя линейку окуляр-микрометра с рассчитанной ценой деления.

ХОД РАБОТЫ

Для окраски по Граму следует использовать молодые, активно растущие культуры, обычно 24 или 48-часовые. Чем старше

культура тем труднее интерпретировать результат и тем выше вероятность ошибки.

Часть I. Окраска по Граму в модификации Синёва

1. Приготовьте смесь бактерий *Sarcina flava* и *Pseudomonas fluorescens* в 0,87 % растворе NaCl. **Не используйте дистиллированную воду ни на одном из этапов окрашивания.**

2. Сделайте фиксированный мазок.

3. На фиксированный мазок наложите бумажку Синёва (фильтровальная бумага, пропитанная раствором генцианвиолета и высушенная) налейте 2...3 капли воды, окрашивайте 2 минуты.

4. Петлей или пинцетом удалите бумажку Синёва в лоток, слейте избыток краски и нанесите 2...3 капли раствора Люголя на 1 минуту.

5. Слейте избыток краски, нанесите 96 % этиловый спирт-ректификат на 30 секунд, для обесцвечивания грамотрицательных бактерий, промойте мазок водой.

6. Дополнительно окрасьте препарат фуксином Пфейфера 2 минуты, промойте водой, высушите.

7. Микроскопируйте с иммерсией.

В результате окрашивания по этому методу грамположительные бактерии приобретают фиолетовый цвет, а грамотрицательные становятся красными.

Недостатком этого метода является использование близких по оттенку красителей

(фиолетовый+пурпурный) и неопытный исследователь может ошибиться. Основные ошибки начинающего исследователя (независимо от используемого метода) приведены в таблице 2-3.

Часть II. Окраска по Граму в модификации с бриллиантовым зелёным

1. Приготовьте смесь бактерий *Sarcina flava* и *Pseudomonas fluorescens* в 0,87 % растворе NaCl. **Не используйте дистиллированную воду ни на одном из этапов окрашивания**

2. Сделайте фиксированный мазок.

3. Нанесите на мазок 1 % водный раствор бриллиантового зелёного на 1 минуту, затем промойте водой.

4. Нанесите на мазок раствор Люголя на 1 минуту, затем промойте водой.

5. Обработайте мазок иодным спиртом в течение 10...15 секунд, затем промойте водой (0,1 % йода и 0,5 % иодида калия в 96 % или абсолютном спирте).

6. Дополнительно окрашивайте мазок 1 % водным раствором сафранина 1 минуту, затем промойте водой.

7. Микроскопируйте с иммерсией.

В результате окрашивания по этому методу грамположительные бактерии приобретают цвет от фиолетового до хаки, а грамотрицательные становятся красными (рис. 2-3).

Преимуществами этого метода является использование более контрастной цветовой комбинации красителей (зелёный+красный а также использование иодного спирта, который медленнее обесцвечивает Гр+ бактерии и быстрее – Гр-)

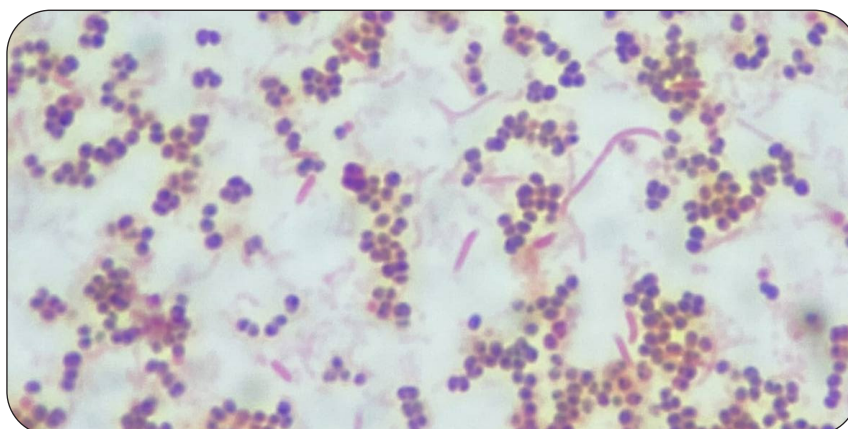


Рисунок 2-3. Результаты окраски по Граму в модификации с бриллиантовым зелёным. Хорошо видны фиолетовые грамположительные кокки и красные грамотрицательные палочки; $\times 1000$

Таблица 2-3

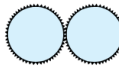
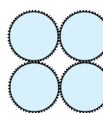
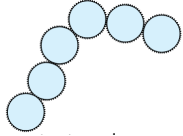
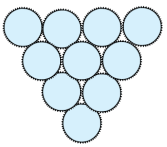
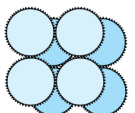
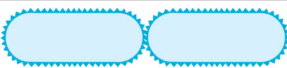
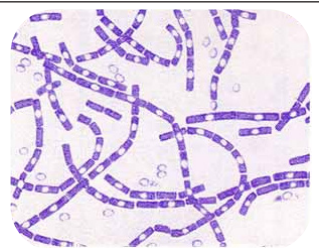
Наиболее типичные ошибки при окраске по Граму

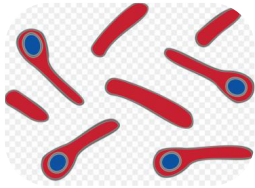
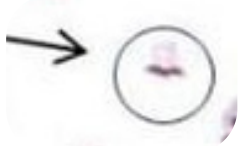
Явление	Возможные причины
Все бактерии (Гр+ и Гр-) в смеси окрасились в красный цвет	Мазок переобесцвечен: слишком долго промывали спиртом или не сразу смыли спирт водой
	Спирт для промывания низкой концентрации (очень быстрое обесцвечивание мазка)
	Бактериальные культуры старые
	Грамположительная культура выращена на неподходящей (напр. селективной) среде

Явление	Возможные причины
Все бактерии (Гр+ и Гр-) в смеси окрасились в «промежуточные» оттенки, отчётливой разницы нет	Использовалась дистиллированная вода
	Особенности строения клеточной стенки: «грамвариабельные бактерии» Окраска по Граму не подходит для определения типа клеточной стенки
Все бактерии (Гр+ и Гр-) в смеси окрасились в фиолетовый цвет	Мазок слишком толстый или комковатый. Разбавьте суспензию
	Мазок плохо обесцвечен: слишком недолго промывали спиртом

Таблица 2-4

Морфологические типы бактериальных клеток

Морфологический тип	Морфологическая группа	Описание	Рисунок
Кокковидные (сферические)	монококки (микрококки)	Одиночные клетки округлой, овальной, ланцетовидной или бобовидной формы	
	диплококки	Пары клеток округлой, овальной, ланцетовидной или бобовидной формы	
	тетракокки	Скопления из четырёх округлых клеток	
	стрептококки	Цепочки округлых клеток	
	стафилококки	Скопления неправильной формы округлых клеток, напоминающие грозди винограда	
	сарцины	Скопления в виде пачек из 8, 16, 32 и т. д. округлых клеток	
Палочковидные	бактерии	Одиночные палочки, не образующие спор	
	диплобактерии	Парные палочки, не образующие спор	
	стрептобактерии	Цепочки палочек, не образующих спор	
	бациллы	Одиночные палочки, образующие споры, не превышающие диаметр клетки	
	стрептобациллы	Цепочки палочек, образующих споры, не превышающих диаметр клетки	

Морфологический тип	Морфологическая группа	Описание	Рисунок
Палочковидные	кlostридии	Одиночные палочки, образующие споры, превышающие диаметр клетки	
Изогнутые (спиралевидные)	вибрионы	С одним изгибом, меньше половины окружности (форма «запятой»)	
	спириллы	Толстые спирально закрученные, с 2...3 витками, равными или больше половины окружности	
	спирохеты	Тонкие спирально закрученные, с большим количеством мелких крутых завитков	
	кампилобактерии	В виде одного полного завитка спирали («крыло чайки»), часто расположены попарно	 
Нитевидные	постоянные нити	Многоклеточные формы из палочковидных клеток, соединенных в длинные цепи с помощью слизи, общих чехлов или цитоплазматических мостиков, или одноклеточные разветвленные	
	временные нити	Образуются палочковидными клетками при нарушении деления, могут ветвиться	

Вопросы для подготовки к тестированию на занятии № 3

1. Для чего применяется метод окраски по Здровцовскому? В какие цвета окрашиваются элементы препарата?

2. Запишите последовательность окраски капсул бактерий по методам Бурри-Гинса и Баха-Дрободько.

3. Для окраски каких микроорганизмов применяют метод Романовского-Гимзы?

4. Какие методы микроскопирования подходят для изучения спирохет?

5. Какие из спирохет хорошо окрашиваются анилиновыми красителями?

6. Какие из спирохет имеют S-образные завитки на концах клеток?

7. Что такое капсула бактерий? Её функции?

8. Каков химический состав капсул большинства бактерий? Какие есть исключения?

9. Какую характерную форму клеток имеют спирохеты?

10. Перечислите роды спирохет, включающих патогенных представителей.

11. Какую форму имеют клетки актиномицетов? Почему их раньше называли «лучистыми грибами»? Что такое друзы?

12. Перечислите роды актиномицетов, включающих патогенных представителей.

13. Опишите морфологические особенности риккетсий?

14. Как паразитируют риккетсии в организме человека? Как обнаружить риккетсий внутри поражённых клеток?

15. Что такое ретикулярные и элементарные тельца хламидий? Почему хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами?

16. Почему хламидий называют энергетическими паразитами?

17. Как обнаружить хламидий внутри поражённых клеток?

18. Назовите характерную особенность строения клеток микоплазм? Как это связано с их морфологией?

19. Почему микоплазм называют мембранными паразитами?

Лабораторная работа № 3

Морфология и строение групп микробов. Методы обнаружения капсул бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Спирохеты. 2. Хламидии. 3. Микоплазмы. 4. Риккетсии. 5. Актиномицеты. 6. Сложные методы окраски.	Рисунок 1. мазок капсульных бактерий, окраска по Бурри-Гинсу, $\times 1000$; Рисунок 2. мазок капсульных бактерий, окраска по Баху-Дрободько 2. Особые группы бактерий. 3. Структура простого и сложного вируса	Записать методики, их назначение и зарисовать микроскопическую картину окраски по: Нейссеру 1. Ожешко 2. Бурри-Гинсу 3. Циллю-Нильсену 4. Здродовскому 5. Романовскому-Гимзе

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Капсулы бактерий

Некоторые бактерии и дрожжи обладают внешней защитной структурой, чётко связанной с клеточной стенкой. Она называется капсулой. Капсула защищает бактерий от пересыхания, фагоцитоза, антител, бактериофагов, является фактором патогенности. Это не обязательный компонент бактериальной клетки: если клетка теряет его она не погибает. Капсула имеет разную толщину у разных видов, от 0,5 до 10 мкм. Структуру, толщиной менее 0,2 мкм принято называть *микрокапсулой*, её видно только в электронном микроскопе.

У большинства видов, способных образовывать капсулу, она состоит из полисахаридов и воды, однако, у некоторых бактерий, например возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, она полипептидная. В состав капсулы входят также полисахаридные молекулы, обладающие антигенными свойствами. Капсульные антигены называют К-антигенами.

Многие виды бактерий образуют капсулу только попав в неблагоприятные условия

среды, например в организм человека и не образуют её при росте на питательных средах. В этом случае для обнаружения капсул готовят мазки-отпечатки из поражённой ткани.

Примерами микроорганизмов, образующих капсулу являются патогенные для человека *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, а также непатогенные виды родов *Rhizobium*, *Azotobacter*, патогенные только для растений виды рода *Agrobacterium*. Среди эукариотических организмов также встречается эта способность: клетки многих видов дрожжей, особенно обитающих на твёрдых поверхностях (листья растений, почва) образуют прочную капсулу; таким же свойством обладает патогенный для человека вид *Cryptococcus neoformans*. Симбионты теплокровных из рода *Malassezia* (дрожжеподобные грибы, обитающие на коже) также образуют капсулу.

Поскольку наличие капсулы часто связано с патогенностью микроорганизма, опре-

деление способности данного штамма образовывать капсулу является важным для диагностики. Капсула плохо проницаема для большинства основных красителей; поэтому для её обнаружения часто применяется методика негативного окрашивания: краситель

окрашивает фон, но не проникает в капсулы, которые выглядят как ореолы вокруг границ клетки. Для проведения исследований желательно использовать молодые культуры (как минимум 5-суточные).

Часть II. Жгутики бактерий

Многие бактерии подвижны. Органами движения бактерий являются жгутики – тонкие нити, состоящие главным образом из белка *флагеллина*, которые совершают вращательные движения, «ввинчивая» бактерию в субстрат.

Различают несколько типов жгутикования (рис. 3-1):

- атрихи – бактерии, лишённые жгутиков
- монотрихи – бактерии с одним жгутиком
- лофотрихи – бактерии с пучком жгутиков на одном из полюсов клетки
- амфитрихи – бактерии с двумя полярными жгутиками
- перитрихи – бактерии, покрытые множеством жгутиков
- амфилофотрихи – бактерии с двумя пучками жгутиков на полюсах клетки

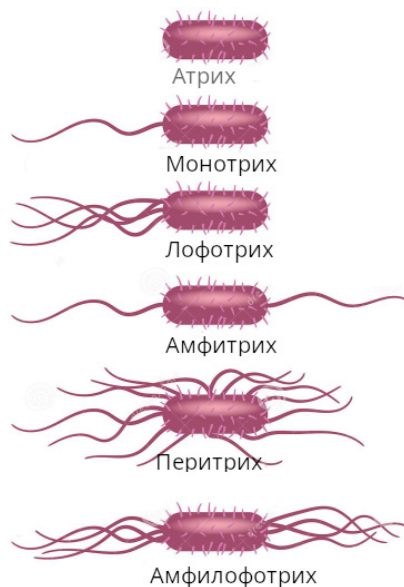


Рисунок 3-1. Типы жгутикования бактерий

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Обнаружение капсул бактерий

а) «Классический» метод: Окраска по Бурри-Гинсу

1. Нанести на предметное стекло каплю чёрной туши. Тушь не растворяется в воде и не может проникнуть в капсулу и окрасить её.

2. Внести в каплю туши петлю биомассы бактерий и тщательно распределить бактерий в капле.

3. Шлифованным краем второго предметного стекла под углом 45 градусов равномерно (см. рис. 3-2) размазать полученную суспензию по предметному стеклу.

4. Дать препарату высохнуть. **Не фиксировать!**

5. Нанести на высохший препарат фуксин Пфейффера на 1–2 минуты.

6. Промыть препарат водой, дать высохнуть, микроскопировать с масляной иммерсией.



А – приготовление тонкого мазка



Б – правильно приготовленный мазок

Рисунок 3-2. Приготовление мазка для окраски капсул

Результат окрашивания: бактерии красные, вокруг них бесцветный ореол капсулы, фон препарата – чёрно-красный (рис. 3-3).

б) Метод Баха-Дрободзько

1. Нанести на предметное стекло каплю 3 % водного раствора конго красного. Этот краситель не проникает внутрь капсул бактерий, создавая фон препарата. Конго красный является не только красителем, но и индикатором, меняющим свой цвет с красного на синий в кислой среде.

2. Рядом с каплей красителя бактериальной петлей нанести на стекло исследуемую культуру и в течение 2–3 минут тщательно перемешивать биомассу бактерий с красителем для равномерного распределения. Полученный препарат необходимо тонким слоем распределить по предметному стеклу (см. рис. 3-2).

3. Дать препарату высохнуть. **Не фиксировать!**

4. На высохший препарат на 40–60 секунд нанести 5 % спиртовой раствор фуксина, в который *ex tempore* добавлена соляная кислота из расчёта 3 мл HCl на 100 мл красителя. Под действием кислоты конго красный меняет цвет и фон препарата становится синим. Фуксин проникает сквозь капсулу, окрашивая бактерий в красный цвет. Капсула не окрашивается.

5. Промыть препарат **дистиллированной водой**¹, высушить и микроскопировать с увеличением $\times 1000$ используя масляную иммерсию.

6. Сделать вывод о наличии или отсутствии капсул у изучаемой культуры.

Результат окрашивания: бактерии красного цвета, вокруг них бесцветный ореол капсулы, фон препарата – синий (рис. 3-4).

Часть III. Другие методы дифференцирующей окраски

Согласно Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности», к работе с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп допускается только подготовленный персонал.

Поэтому некоторые методы окраски студенты изучают на демонстрационных препаратах и по методическим пособиям.

Окраска по Нейссеру

Этот метод окрашивания предназначен для выявления зёрен волютина – гранул не-

органических полифосфатов, которые являются внутриклеточным резервом фосфора в случае недостатка его в среде.

Обнаружение волютина в ряде случаев представляется очень важным, например, для обнаружения возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* (бациллы Клебса-Лёффлера), у которых гранулы волютина располагаются на полюсах клеток, придавая им вид булавы или гантели (рис. 3-5). Это позволяет дифференцировать возбудителя дифтерии от ложнодифтерийных коринебактерий.

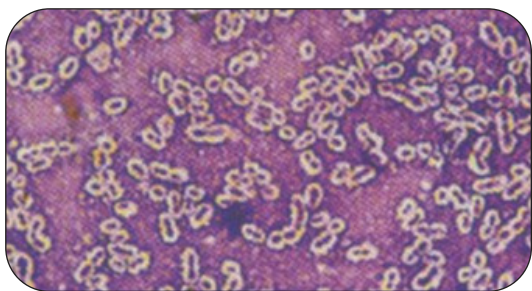


Рисунок 3-3. Результат окрашивания препарата по Бурри-Гинсу

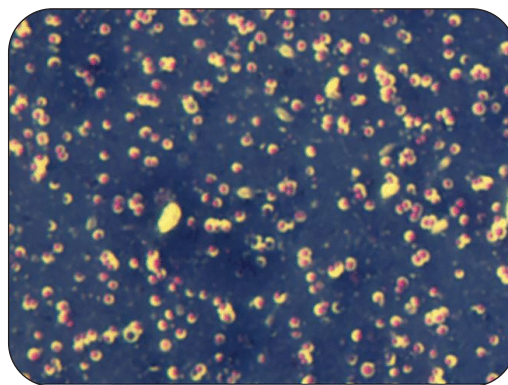


Рисунок 3-4. Результат окрашивания препарата конго красным и кислым фуксином: фон препарата синий, капсулы бесцветные, бактерии красные

¹ В данном случае использование дистиллированной воды является необходимым: её $pH \approx 5,5$ сохранит цвет фона препарата синим. При использовании водопроводной воды ($pH \approx 8,0$) конго красный вернёт изначальный красный цвет)

Окрашивание по Нейссеру проводится двумя красителями:

I. *уксуснокислым синим Нейссера («синька Нейссера»)*

II. *коричневым красителем везувином (бисмаркбрауном)*

I. **Синька Нейссера состоит из двух компонентов:**

Раствор А:

- Метиленовый синий – 0,1 г
- Этиловый спирт – 2 мл
- Уксусная кислота ледяная – 5 мл
- Дистиллированная вода – 100 мл

Раствор Б

- Кристаллвиолет – 1 г
- Этиловый спирт – 10 мл
- Дистиллированная вода – 300 мл

Растворы А и Б смешивают непосредственно перед окраской в отношении 2:1.

II. **Раствор везувина**

Везувин – 1 г; растворить в 300 мл кипящей дистиллированной воды

Ход окрашивания:

1. На фиксированный мазок наносят синьку Нейссера на 3...4 минуты
2. Наносят раствор Люголя на 30...60 секунд
3. Не промывая водой, окрашивают везувином 1...3 мин.
4. Промывают водой, высушивают.
5. Микроскопируют с иммерсией.

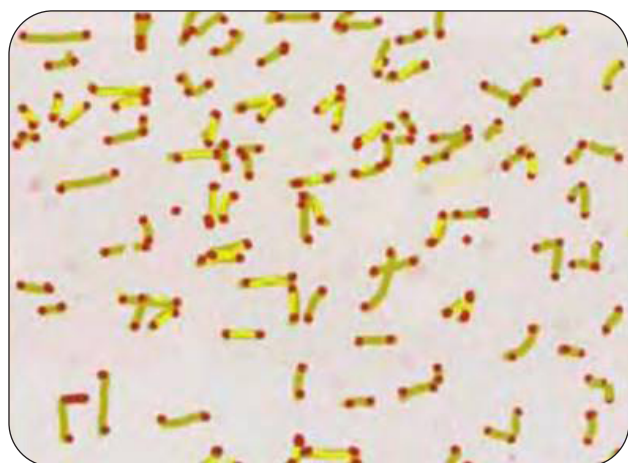


Рисунок 3-5. Окрашка *Corynebacterium diphtheriae* по Нейссеру.
Хорошо видны
полярно расположенные зерна волютина

Окраска по Здродовскому

Этот метод окрашивания применяется прежде всего для обнаружения риккетсий внутри пораженных клеток. Из-за высокого содержания в клеточных стенках риккетсий липидов они плохо воспринимают обычные анилиновые красители. Основным красителем в этом методе является карболовый фуксин Циля – «жесткий» краситель с высокой концентрацией фуксина и фенола.

Ход окрашивания:

1. На мазок наносят разведённый карболовый фуксин Циля (15 капель красителя на 10 мл дистиллированной воды) на 5 минут, затем промывают водой

2. Промывают мазок 0,5 % раствором лимонной кислоты (можно использовать 0,01 % HCl). Риккетсии остаются окрашенными, все остальные элементы препарата обесцвечиваются.

3. Промывают мазок водой.

4. Докрашивают мазок 1 % водным раствором метиленового синего 1 минуту, затем промывают водой.

В результате окрашивания риккетсии красные, цитоплазма поражённых клеток голубая, ядра – синие (рис. 3-6).

Кроме метода Здродовского для обнаружения риккетсий можно использовать методы Романовского-Гимзы, Циля-Нильсена, Маккиавело, Гименеса.

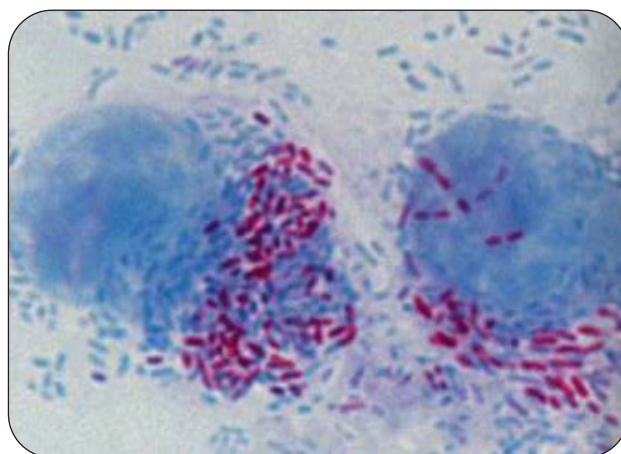


Рисунок 3-6. Риккетсии в пораженных клетках: бактерии окрашены в красный цвет фуксином, остальные элементы препарата окрасились метиленовым синим

Окраска по Романовскому-Гимзе

Окраска по Романовскому-Гимзе – тонкий и сложный метод окрашивания, успех которого определяется опытом исследователя, качеством приготовления красителя, правильно подготовленного препарата и даже рН среды, в которой производится окрашивание.

В начале 90-х гг. XIX века Д.Л. Романовский (рис. 3-7) обнаружил, что при длительном контакте с кислородом воздуха свойства смеси красителей – метиленового синего и эозина изменяются. Как предполагается, изменение свойств связано с отщеплением метильных групп метиленового синего с образованием дезаминированных продуктов и производных красителя, что способствует полихромному (многоцветному) окрашиванию препарата.



Рисунок 3-7. Л.Д. Романовский

Для окраски по методу Романовского-Гимзы предпочтительно использовать готовую концентрированную смесь фабричного производства, в состав которой входят красители азур II (смесь азура I и метиленового синего), эозин, а также глицерин и метиловый спирт.

Концентрированный краситель разводят в соотношении обычно 1:10 или 1:20 в фосфатном буферном растворе определенного рН: для препаратов костного мозга – 5,8...6,0, для тонкого мазка крови – 6,4...6,5, для выявления простейших 6,8, для малярийного плазмодия в крови – 7,0...7,2. Рабочий раствор можно хранить не более 6 часов.

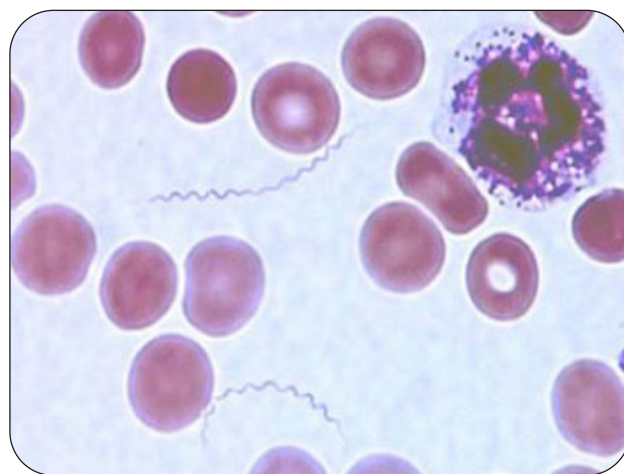
Затем на фиксированный (для каждого объекта исследования методика фиксации своя) мазок наносят рабочий раствор красителя на 25...120 минут, затем промывают, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Бактерии вследствие окрашивания приобретают фиолетово-красный оттенок, цитоплазма клеток – голубой цвет, ядра – красный. Вследствие окраски простейших их цитоплазма становится голубого цвета, а ядра – красно-фиолетового (рис. 3-8).

Для спирохет эта окраска может использоваться как способ первичной дифференциации, потому что спирохеты разных родов окрашиваются в разные цвета (см. часть III теоретического раздела лабораторной работы № 1):



А



Б

Рисунок 3-8. Результаты окрашивания по Романовскому-Гимзе: А – простейшее *Trichomonas vaginalis*, Б – спирохета *Borrelia hermsii* в мазке крови

- р. *Treponema* в розовый;
- р. *Leptospira* – в красный;
- р. *Borrelia* – в синий.

Определение подвижности бактерий и окраска жгутиков

Определение подвижности бактерий и тип жгутикования – один из важнейших признаков, используемых для идентификация вида микроорганизма.

Для определения подвижности бактерий лучше всего подходят культуры, выращенные на жидких питательных средах.

Подвижность препарата определяют в препарате типа «висячая капля». Такие препараты готовятся на специальных предметных стёклах с лунками (рис. 3-9). Предварительно края лунки смазывают вазелиновым маслом для предотвращения быстрого высыхания препарата.

Маленькую каплю культуры, выросшей на жидкой среде наносят на покровное стекло, в его центр (рис. 3-10 (1)). Капля должна быть небольшой, чтобы не касаться дна лунки. Затем покровное стекло быстро переворачивают (рис. 3-10 (2)) и помещают над лункой (рис. 3-10 (3)).

После приготовления препарата его помещают на предметный столик микроскопа и при малом увеличении фокусируют изображение на краю капли. Конденсор слегка опускают и прикрывают его диафрагму для повышения контрастности. Затем меняют объектив на более сильный (увеличение $\times 400$ или $\times 900$) и наблюдают за подвижностью бактерий. В зависимости от типа жгу-



Рисунок 3-9. Предметное стекло с лункой

тикования характер движения будет различаться.

Впервые метод окраски жгутиков бактерий предложил Роберт Кох еще в XIX веке, затем были разработаны и другие методы их обнаружения. Ни один из них не отличается ни лёгкостью, ни простотой. Объясняется это тем, что жгутики микроорганизмов очень тонкие – 10–30 нм, что меньше разрешающей способности светового микроскопа. Чтобы рассмотреть жгутики препарат обрабатывают протравами – веществами, которые способствуют осаждению на них ионов серебра или железа, что увеличивает их диаметр и делает их видимыми под микроскопом.

Каплю исследуемой культуры помещают на новое или специально подготовленное предметное стекло. Стекло должно быть исключительно чистым. Дают капле высохнуть и фиксируют осторожным нагреванием или химическим способом. Затем препарат окрашивают либо серебрением (см. лабораторную работу № 4) либо одним из перечисленных способов.

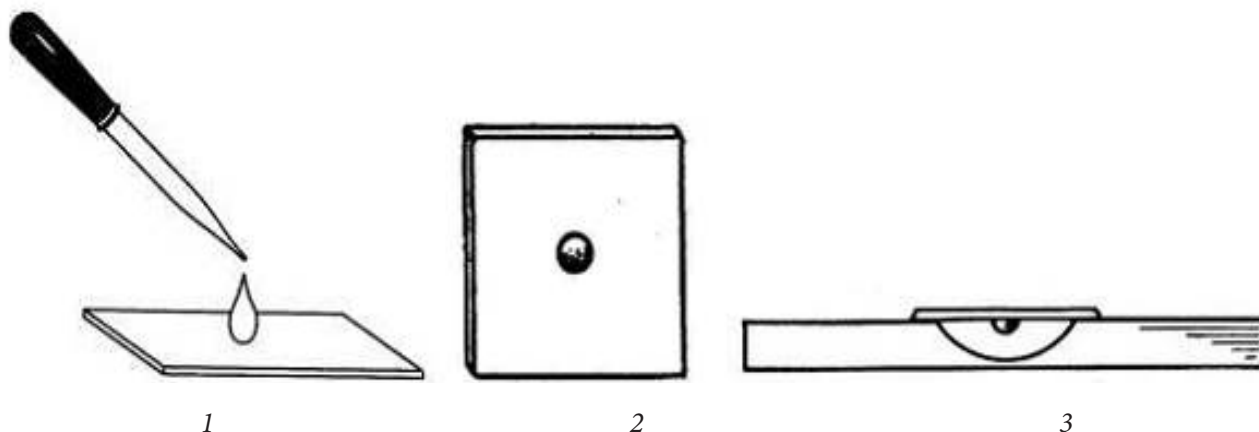


Рисунок 3-10. Схема приготовления препарата «висячая капля». Пояснения в тексте

Окраска жгутиков по Лёффлеру

1. После фиксации препарата его протравливают 1 минуту при подогревании раствором следующего состава:

танин (20 % водный раствор)	100 мл
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора, насыщенный водный раствор)	50 мл
основной фуксин (насыщенный спиртовой раствор)	10 мл

2. Промывают мазок водой

3. Нанести карболовый фуксин Циля и подогревать 2–3 минуты

4. Промыть водой, подсушить, микроскопировать с иммерсией

Комбинированная окраска по Heimb-rook et al.

Для окраски этим методом понадобятся несколько ингредиентов:

Раствор Рю (Ryu) I. Он состоит из:

Фенол (5 % водный раствор)	10 мл
Танин	2 г
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (алюмокалиевые квасцы, насыщенный водный раствор)	10 мл

Раствор Рю (Ryu) II. Он состоит из:

Кристаллический фиолетовый (12 % спиртовой раствор)	100 мл
---	--------

Перед окраской готовят рабочий раствор, смешивая 1 часть раствора I и 10 частей раствора II. Раствор фильтруют.

Процедура окрашивания:

1. На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю воды, и бактериальной петлёй отбирают немного культуры из жид-



Рисунок 3-11. Жгутики *Proteus vulgaris*, окрашенные по Heimb-rook et al.

кой среды и не перемешивая вносили в каплю воды. Оптимальный объем капли – когда едва хватает жидкости, чтобы заполнить пространство под покровным стеклом;

2. Слабо мутную каплю накрывают покровным стеклом.

3. Через 5...10 минут, когда примерно половина клеток прикрепится к предметному или покровному стеклу, на край покровного стекла наносят две капли рабочего раствора красителя Рю.

4. Через 15...30 минут проверяют препарат на наличие жгутиков у бактерий (рис. 3-11).

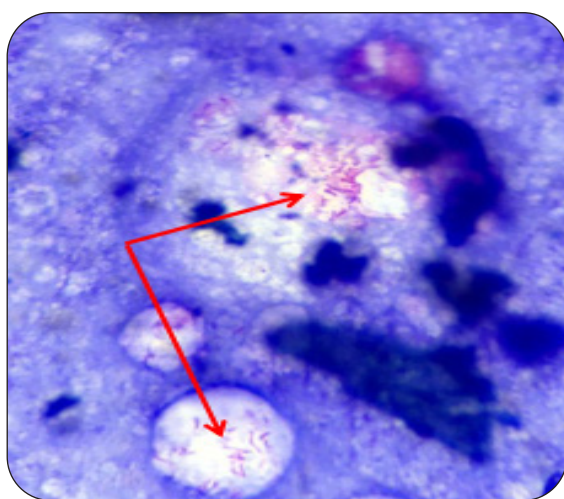
Окраска по Цилю-Нильсену

Этот метод окраски предназначен для обнаружения кислотоустойчивых бактерий в поражённых тканях и различном отделяемом. Метод был разработан бактериологом Францем Цилем и патологоанатомом Фридрихом Нильсеном (рис. 3-12).

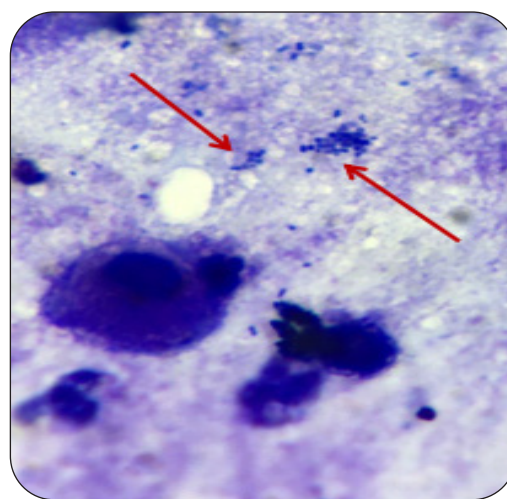
К кислотоустойчивым бактериям относятся микробактерии – возбудители туберкулёза и лепры, актиномицеты и некоторые другие микроорганизмы. Их отличительной чертой является высокая гидрофобность клеточной стенки, обусловленная наличием большого количества липидов. Поэтому окрасить эти бактерии обычными растворами анилиновых красителей обычно не удастся. Принципом окрашивания по Цилю-Нильсену является одновременное воздействие на микроорганизм сильного протравливающего вещества – карболовой кислоты и нагревание до высоких температур. При таких условиях краситель (фуксин) может проникнуть в клетку и прочно окрасить клеточные структуры. Последующее промывание мазка слабым раствором кислоты приведет к обесцвечиванию всех элементов препарата, кроме таких бактерий, **поэтому они и получили название кислотоустойчивых**. Для того, чтобы увидеть остальные элементы мазка проводят контрокрашивание метиленовым синим. При микроскопировании возбудители туберкулёза, лепры, актиномикозов выглядят рубиново-красными, а ткани, мокрота, другие микроорганизмы – синими (рис. 3-13).



Рисунок 3-12. Франц Циль (слева) и Фридрих Нильсен (справа)



А



Б

Рисунок 3-13. Результаты окрашивания мокроты по Циль-Нильсену: рубиново-красные кислотоустойчивые микобактерии – возбудители туберкулёза (А) и окрасившиеся в синий цвет некислотоустойчивые возбудители пневмонии (Б)

Для окраски этим методом понадобятся несколько ингредиентов:

Раствор I:

Растворите 0,3 г основного фуксина в 10 мл 96 % этилового спирта

Раствор II:

Растворите 5 г фенола в 100 мл дистиллированной воды

Раствор III:

Смешайте 10 мл раствора I и 90 мл раствора II.

Раствор IV:

К 97 мл 96 % этилового спирта добавьте 3 мл концентрированной соляной кислоты.

Раствор V:

Растворите 0,3 г хлорида метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды.

Использование смеси спирта и соляной кислоты преимущественнее использования водного раствора кислоты, поскольку среди сапротрофной микрофлоры имеются кислотоустойчивые, но спиртоподатливые представители, в то время как возбудители туберкулёза всегда и спирто-, и кислотоустойчивы.

Процедура окрашивания:

1. Приготовьте фиксированный мазок исследуемого материала

2. На мазок положите полоску фильтровальной бумаги и обильно смочите её раствором III.

3. Нагрейте мазок над пламенем горелки до появления паров красителя

4. Дайте мазку остыть, пинцетом удалите фильтровальную бумагу и промойте мазок водопроводной водой.

5. В течение 3 минут обесцвечивайте мазок раствором IV, затем промойте водой.

6. В течение 1 минуты окрашивайте препарат раствором V, промойте, высушите, микроскопируйте с иммерсией.

Вопросы для самоподготовки к занятию 4:

1. Опишите технику серебрения мазков по Морозову. Для каких микроорганизмов целесообразно её применять?

2. Назовите достоинства и недостатки серебрения по Морозову.

3. Опишите технику окрашивания эндоспор бактерий по методу Шеффера-Фултона. Как окрашиваются элементы препарата?

4. Опишите технику окрашивания эндоспор бактерий с использованием бриллиантового зелёного и сафранина. Как окрашиваются элементы препарата?

5. Назовите принципиальное отличие электронной микроскопии от световой

6. Какие объекты позволяет изучать электронный микроскоп?

7. Почему споры бактерий устойчивы к неблагоприятным условиям среды?

8. Что такое плектридиальный тип спорообразования? кластридиальный?

9. Чем отличается образование спор у бактерий рода *Bacillus* от бактерий рода *Clostridium*?

10. Какие бактерии могут образовывать эндоспоры?

11. Каково назначение бактериальных спор?

12. Чем понятие «вирион» отличается от понятия «вирус»?

13. Назовите три принципиальных отличия вирусов от клеточных форм жизни

14. Какой признак является основополагающим для таксономии вирусов?

15. Перечислите остальные признаки, важные для систематики вирусов

16. Из каких компонентов состоят вирусы, называемые простыми?

17. Что такое капсид? Что такое капсомер?

18. В чем отличие сложноорганизованных вирионов от простых?

19. Что такое суперкапсид и как он формируется?

20. Какова функциональная роль прямых или инвертированных концевых повторов нуклеотидов в вирусной ДНК?

21. Что такое позитивный и негативный геном РНК-вирусов?

22. Зачем РНК-содержащим вирусам нужен «кэп» («шапочка»)?

23. В чем заключается разница между структурными и функциональными белками вирусов?

24. В чем заключается разница между вирионными и вирусиндуцированными ферментами?

25. Что такое дефектные вирусы?

26. Как называются дефектные вирусы, содержащие только часть генетической информации исходного вируса? Они репродуцируются только при участии родственного им вируса-помощника.

27. Как называются дефектные вирусы, которые для репродукции требуют участия любого вируса-помощника, необязательно родственного исходному вирусу? Приведите пример такого вируса

28. Как называются дефектные вирусы, которые представляют собой по сути про-вирусы, которые потеряли способность превращаться в полноценный вирус?

29. Что такое бактериофаг? Опишите структуру типичного фага.

30. Что такое негативная колония фага?

31. Как относятся бактериофаги к факторам окружающей среды? К каким воздействиям они устойчивы, а к каким – нет?

32. Что такое прионы? Как они размножаются?

33. Какую ткань в человеческом организме поражают прионы?

34. Как иммунная система человека реагирует на появление прионов?

Лабораторная работа № 4

Обнаружение эндоспор бактерий. Морфология вирусов

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Изучение спорообразования у бактерий. 2. Особенности систематики вирусов. 3. Морфология вирусов. 4. Структура простых вирусов. 5. Структура сложных вирусов. 6. Особенности морфологии и структуры фагов. 7. Дефектные вирусы. 8. Прионы.	1. Обнаружение спор бактерий. 2. Структура простого вируса 3. Структура сложного вируса. 4. Морфология приона.	1. Обнаружение эндоспор бактерий. Окраска по Шефферу-Фултону 2. Методы изучения морфологии вирусов: а) Электронная микроскопия. б) Окраска по Морозову.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Спорообразование бактерий

Спорообразование – защитная функция некоторых грамположительных бактерий (и небольшого количества грамотрицательных) для сохранения жизни особи при неблагоприятных условиях. Например, возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* в организме животного или человека существует в виде обычных вегетирующих клеток как палочковидная бактерия; попав же в окружающую среду бактерии сразу же приступают к спорообразованию, что приводит к загрязнению территории спорами возбудителя и превращению участка в опасный источник инфекции.

Обычно спорообразование у бактерий начинается при:

- обеднении среды питательными веществами;
- накоплении в среде продуктов метаболизма выше допустимого уровня;
- появлении в атмосфере среды обитания кислорода (например: для анаэробных бактерий, таких как бактерии р. *Clostridium*, кислород ядовит);

- неблагоприятной температуре для развития.

Следует иметь ввиду, что **спорообразование не является способом размножения бактерий**.

Образование эндоспоры – сложный, многоэтапный процесс, при котором часть простопласта клетки вокруг нуклеоида обособляется, происходит изменение его химического состава, затем *проспора* покрывается многослойной оболочкой, переходит в состояние глубокого покоя и становится *спорой* – покоящейся стадией развития бактерии, устойчивой к воздействиям окружающей среды.

Такая структура позволяет спорам сохраняться в течение многих лет и десятилетий и, при наступлении благоприятных условий, прорасти в вегетативную клетку (рис. 4-1).

Эндоспоры бактерий устойчивы:

- к кипячению на протяжении длительного времени;
- к высушиванию;
- к ультрафиолетовым лучам;
- к ионизирующим излучениям.

При микроскопировании старых культур, обычно выросших на плотных питательных средах споры обычно хорошо заметны в виде овальных сильно преломляющих свет внутриклеточных структур. Однако, не следует считать любую сильно преломляющую свет структуру эндоспорой, следует провести тест на теплоустойчивость и окрасить мазок одним из способов (см. ниже).

Тест на теплоустойчивость

Исследуемую культуру засевают в жидкую питательную среду в пробирку, закрывают её ватной пробкой и прогревают в кипящей водяной бане 15 минут. Во время

прогрева вегетирующие клетки погибнут, а споры сохранятся жизнеспособными и через некоторое время прорастут и разовьются в новую культуру, это будет заметно по помутнению жидкой среды (см. рис. 4-1).

Принято считать, что если у палочковидных бактерий спора по диаметру не превышает диаметр клетки, то эту бактерию следует отнести к роду *Bacillus*, а если больше чем диаметр клетки – то к роду *Clostridium* (см. рис. 4-2). Однако, это деление достаточно условно: например у бактерий *Bacillus polymyxa*, *B. stearothermophilus* спора больше чем диаметр клетки и, расположенная в центре клетки, придаёт ей выпуклую форму веретена.

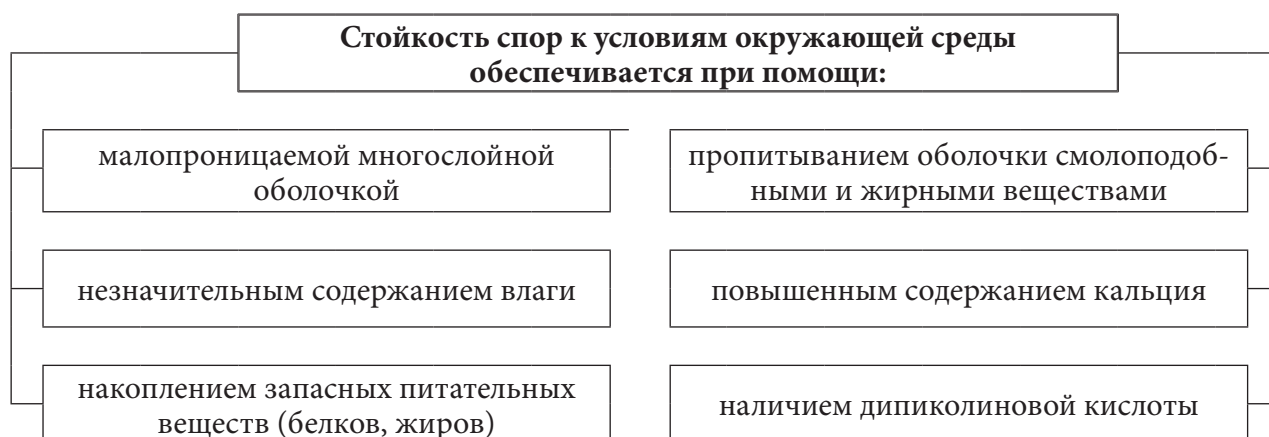


Рисунок 4-1. Факторы устойчивости эндоспор бактерий к условиям среды

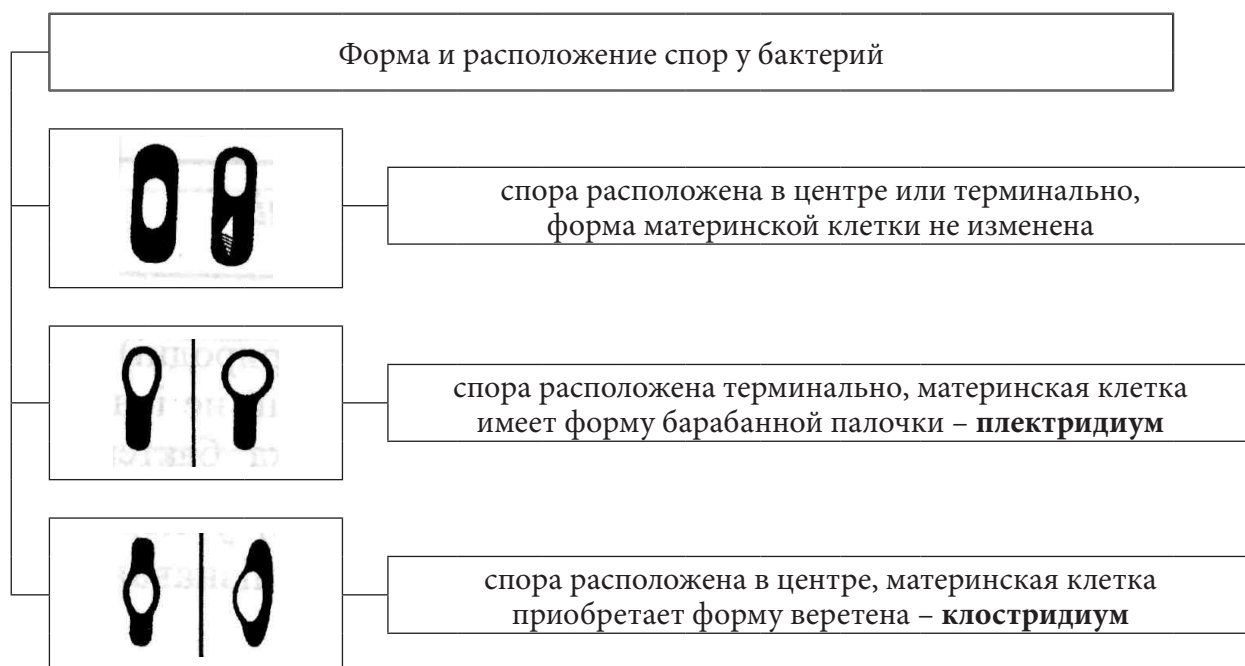


Рисунок 4-2. Основные типы спорообразования бактерий

Наибольший практический интерес представляют спорообразующие бактерии рр. *Bacillus* и *Clostridium*.

Большинство представителей рода *Bacillus* являются сапротрофами, обитающими в основном в почвах, богатых органическим веществом. Патогенным для человека и животных представителем является *Bacillus anthracis* – возбудитель сибирской язвы животных и человека; *Bacillus thuringiensis* вызывает заболевания насекомых и используется как биопестицид.

В род *Clostridium* входят строго анаэробные бактерии, широко распространённые в природе в анаэробных условиях: глубоких слоях почвы, донном иле, кишечном тракте человека и животных. Некоторые из клостридий патогенны: *Cl. tetani* – возбудитель столбняка; *Cl. botulinum* – возбудитель ботулизма; *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl.*

perfringens, *Cl. novyi*, *Cl. sordelli* – возбудители газовой гангрены.

Существует несколько методов обнаружения способности бактерий образовывать споры, например простое окрашивание, методы Пешкова, Ожешко, Шеффера-Фултона и их модификации. Все они основаны на свойстве эндоспор плохо воспринимать красители из-за многослойной малопроницаемой оболочки. Однако споры окрашиваются, если окраску проводить при нагревании или предварительно разрыхлив оболочку споры слабым раствором кислоты. Окрашенная спора при промывании мазка спиртом будет обесцвечиваться гораздо медленнее, чем вегетативная часть клетки и, в итоге, останется окрашенной на фоне бесцветной вегетативной части. Для дифференцировки вегетативной части клеток проводят контрокрашивание мазка другим красителем.

Часть II. Морфология вирусов и фагов

Вирусы – неклеточные формы жизни, состоящие из одного типа нуклеиновой кислоты и белковой оболочки. Некоторые вирусы лишены даже белковой оболочки и представляют собой инфекционную нить РНК; их называют *вириоидами*.

Поскольку вирусы не имеют клеточного строения у них нет собственного обмена веществ и полноценно существовать они могут только внутри живой клетки, являясь облигатными (обязательными) внутрикле-

точными паразитами. Вирусные частицы, находящиеся вне клетки вирусы можно отнести к неживой природе.

Вирусы являются паразитами человека, животных, растений и бактерий.

По своему строению вирусы можно разделить на просто- и сложноустроенные: *оболочечные (простые)* (рис. 4-3) и *безоболочечные (сложные)* (рис. 4-4).

Разница между ними заключается, в первую очередь, в наличии *суперкапсида* – допол-

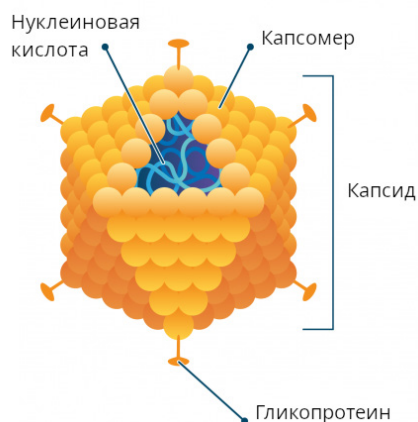


Рисунок 4-3. Схема строения безоболочечного вируса (на примере аденовируса)

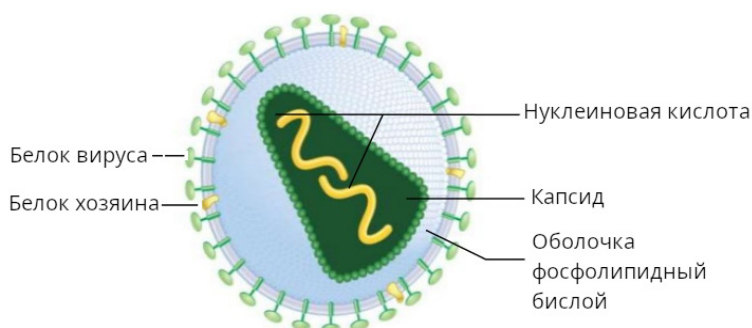


Рисунок 4-4. Схема строения оболочечного вируса (на примере ВИЧ)

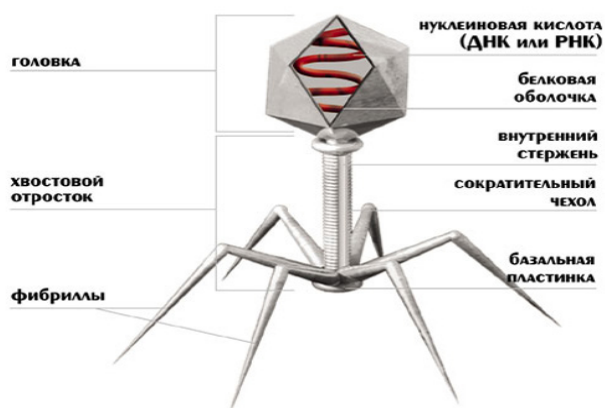


Рисунок 4-5. Схема строения бактериофага

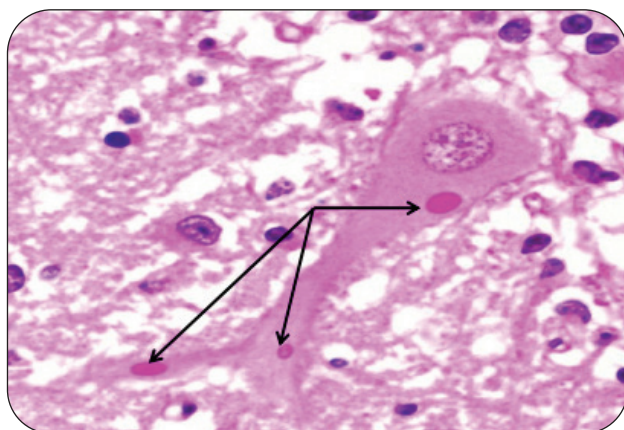


Рисунок 4-6. Срез мозжечка буйвола, показывающий внутрицитоплазматические тельца Бабеша-Негри в клетках Пуркинье

нительного белково-липидного слоя поверх основной белковой оболочки вируса. Суперкапсид вирусы получают, отпочковываясь от клетки хозяина, он является производным клеточной мембраны клетки хозяина.

По форме вирусы могут быть нитевидными (например вирус лихорадки Эбола), палочковидными (например вирус табачной мозаики), сферическими (например вирус иммунодефицита человека) или пулевидными (например вирус бешенства).

Бактериофаги (рис. 4-5) – вирусы, поражающие бактерии. Большинство бактериофагов имеют форму сперматозоида и, в отличие от вирусов человека, не проникают внутрь бактериальной клетки целиком, а «впрыскивают» свою ДНК внутрь заражаемой бактерии.

Вирусы и бактериофаги видны только под электронным микроскопом, однако, некоторые из них способны объединяться внутри клетки хозяина в скопления, напоминающие кристаллы, сильно преломляющие свет. Наличие таких вирусных включений является важным диагностическим признаком некоторых болезней, например, тельца Бабеша-Негри (рис. 4-6) в нейронах гиппокампа – признак бешенства, тельца Гуарниери – симптом поражения вирусом натуральной оспы.

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Окраска спор по методу Шеффера-Фултона

Наиболее часто используемым методом окрашивания эндоспор является **метод Шеффера-Фултона**.

Техника окрашивания:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5 % водный раствор малахитового зелёного и 2...3 раза нагревают в пламени спиртовки до появления паров.

2. Фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой и в течение 30 с докрашивают 0,5 % раствором сафранина.

3. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсией.

Результаты окрашивания: споры окрашиваются в зелёный цвет, клетка – в красный.

Малахитовый зелёный токсичен для многих организмов, в том числе млекопитающих, поэтому его применение ограничено. Вместо него можно использовать другие красители.

Модификация метода Шеффера-Фултона с использованием бриллиантового зелёного и сафранина.

1. Приготовьте фиксированный мазок

2. Накройте мазок полоской фильтровальной бумаги и налейте на бумагу 1 % водный раствор бриллиантового зелёного. На-

гревайте до появления паров 5 минут или поместите стёкла на штатив-рельсы над кипящей водой на 15 минут. Следите, чтобы краситель не высох на мазке, при необходимости добавляйте новые порции краски. Вместо нагревания мазка можно оставить краситель на мазке на 30 минут.

3. Промойте мазок водой

4. Обесцвечивайте мазок йодным спиртом 15 секунд, затем снова промойте водой

5. Докрашивайте 1 % водным раствором сафранина в течение 5 минут

6. Промойте водой, высушите и микроскопируйте с иммерсией.

Результаты окрашивания: споры окрашиваются в зелёный цвет, клетка – в красный (рис. 4-7).

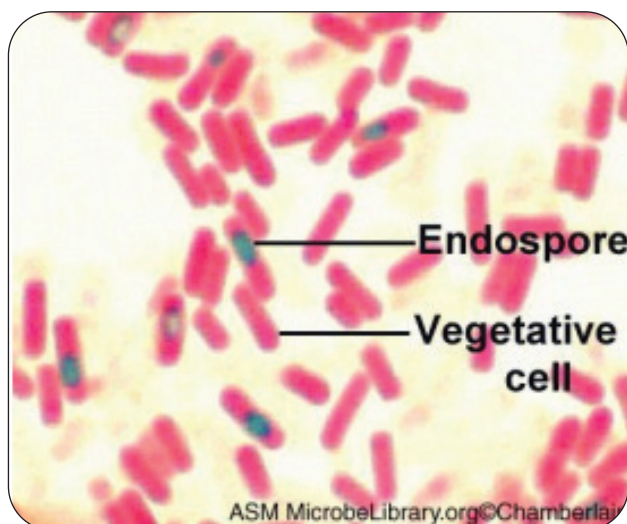


Рисунок 4-7. Окраска эндоспор по Шефферу-Фултону

Часть II. Обнаружение вирусных включений по методу Морозова

Хотя вирусные включения можно окрашивать анилиновыми красителями, часто для их визуализации пользуются методами *серебрения* – обработкой объекта солями серебра. Серебро относится к тяжёлым металлам. В результате взаимодействия его солей с белками происходит восстановление серебра на аргирофильных структурах, которые приобретают коричневый или чёрный цвет (рис. 4-8).

Для обнаружения вирусных включений часто используется **метод серебрения по Морозову**. Этот метод был предложен в 1925 году и является модификацией метода серебрения, предложенного Фонтаной для окраски спирохет. Методы серебрения по Морозову и Фонтане можно использовать как для обнаружения как вирусов так и спирохет, которые плохо воспринимают анилиновые красители.

Основным достоинством методов серебрения, включая метод Морозова, является его высокая чувствительность: на окрашенном препарате становятся чётко видны все трудноразличимые обычными методами элементы, даже жгутики бактерий. Парадоксально, основным недостатком методов серебрения также является их высокая чувствительность: на препарате также становятся заметны осевшие на стекле белковые

частички и другой «мусор», что часто затрудняет прочтение препарата.

Для окраски по методу Морозова необходимы следующие реактивы:

- **реактив № 1** – Готовят смесь их 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 40 % раствора формалина и 100 мл дистиллированной воды;
- **реактив № 2** – 5 г танина, 100 мл жидкой карболовой кислоты и 100 мл дистиллированной воды;
- **реактив № 3** – аммиачный раствор нитрата серебра (в 100 мл дистиллированной воды растворяют 5 г кристаллического ни-

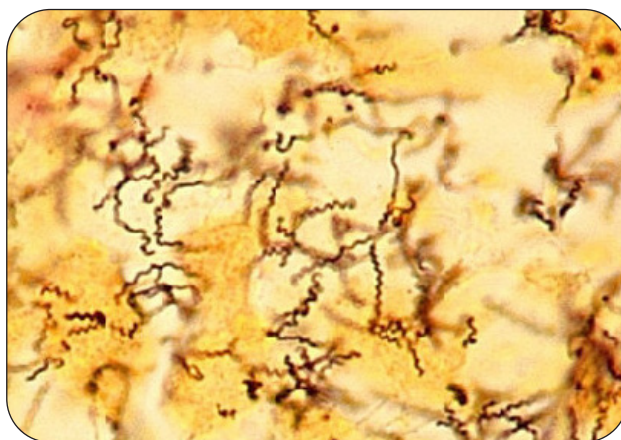


Рисунок 4-8. Результат окраски серебрением: на светло-коричневом фоне хорошо видны спирохеты

трата серебра; из этого количества в отдельный сосуд отливают 20 мл; к остальным 80 мл раствора нитрата серебра по каплям прибавляют крепкий водный раствор аммиака, пока образующийся желто-коричневый, а затем бурно-чёрный осадок не растворится и не останется лишь лёгкая опалесценция; если добавление аммиака вовремя не прекращено, то из оставшихся 20 мл раствора нитрата серебра приливают по каплям этот раствор до появления лёгкой опалесценции), для окраски реактив разбавляют дистиллированной водой 1:10.

Окрашивание проводят в несколько этапов:

Этап 1. Фиксация. Тонкий препарат высушивают на воздухе, но лучше в термоста-

те. На 1 мин наливают на препарат реактив № 1, затем жидкость сливают, препарат обмывают водой.

Этап 2. Протравливание. На препарат наливают реактив № 2 и подогревают в течение 1 минут до появления паров. Тщательно промывают водой.

Этап 3. Импрегнация серебром. На наносят реактив № 3, и осторожно подогревают в течение 1-2 минут. Обработку препарата прекращают, когда мазок становится тёмно-коричневым. Промывают препарат водой, и микроскопируют с иммерсией.

Результаты окрашивания: спирохеты и вирусные включения становятся тёмно-коричневыми или чёрными, фон препарата – желтовато-коричневый.

Вопросы для самоподготовки к занятию 5:

1. Чем представлено вегетативное тело грибов?
2. Что такое гифа? Мицелий?
3. Что такое септированный и несептированный мицелий?
4. Как подразделяются грибы в зависимости от типа строения мицелия?
5. Перечислите отделы грибов с септированным и несептированным мицелием
6. Какой признак положен в основу деления грибов на отделы?
7. Что такое анаморфа и телеоморфа грибов?
8. Как называют грибы, у которых половая стадия развития утрачена или не обнаружена?
9. Что такое диморфизм грибов?
10. Что такое дематиевые и гиалиновые грибы?
11. Что такое сегресомы и хитосомы? Их назначение?
12. Почему некоторые организмы называются грибоподобными?
13. Назовите три способа размножения грибов
14. Что такое оидии (артроспоры)?
15. Что такое хламидоспоры грибов? Для чего они нужны и чем они отличаются от артротроф?

16. Что такое почкование грибов? Что такое псевдомицелий?
17. Что такое склеротии грибов? Для чего они нужны?
18. Чем отличаются споры, образующие при вегетативном размножении от спор, образующихся при бесполом размножении?
19. При каких условиях гриб приступает к формированию бесполого споронотения?
20. Какой тип спор бесполого размножения подвижен?
21. В чем заключается разница в принципе образования спорангиоспор и зооспор от конидий?
22. Какие из видов спор бесполого размножения (конидий) могут быть многоклеточными? Как поможет признак многоклеточности при определении систематического положения гриба?
23. Для чего служат конидии?
24. На каком признаке основано деление царства грибов на отделы?
25. Укажите назначение полового процесса грибов
26. Что такое изогамия? Что образуется в результате? Каким грибам она свойственна?

27. Что такое оогамия? Что образуется в результате? Каким организмам она свойственна?

28. Что такое зигогамия? Что такое гетероталличность и гомоталличность?

29. В чём заключается биологическое отличие между спорами полового размножения высших и низших грибов

30. Что такое аскогамия? Почему аскомицетов называли сумчатыми грибами?

31. Что такое соматогамия? В чём заключается необычность полового процесса базидиомицетов?

32. Что такое дикариотичность гиф?

Лабораторная работа № 5

Морфология и систематика грибов

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Принципы систематики грибов. 2. Морфология грибов. 3. Плесневые и дрожжевые формы. Диморфизм 4. Структура клеток грибов. 5. Специфика химического состава клеток грибов. 6. Споры у грибов. 7. Приготовление раздавленной капли из плесневых грибов.	Рисунки: 1. <i>Mucor</i> sp., 2. <i>Penicillium</i> sp., 3. <i>Aspergillus</i> sp.	Морфологические различия дрожжевых, дрожжеподобных и плесневых грибов

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Морфология и строение грибов

Грибы – большая разнородная группа эукариотических организмов, объединённых в царство *Mycota* (*Fungi*). Известно более 100 000 видов грибов, из которых лишь немногие способны вызывать заболевания

человека или животных. Среди патогенных грибов большинство поражают растения.

Вегетативное тело грибов (рис. 5-1) представлено длинными нитевидными клетками – *гифами*, сплетение которых называют

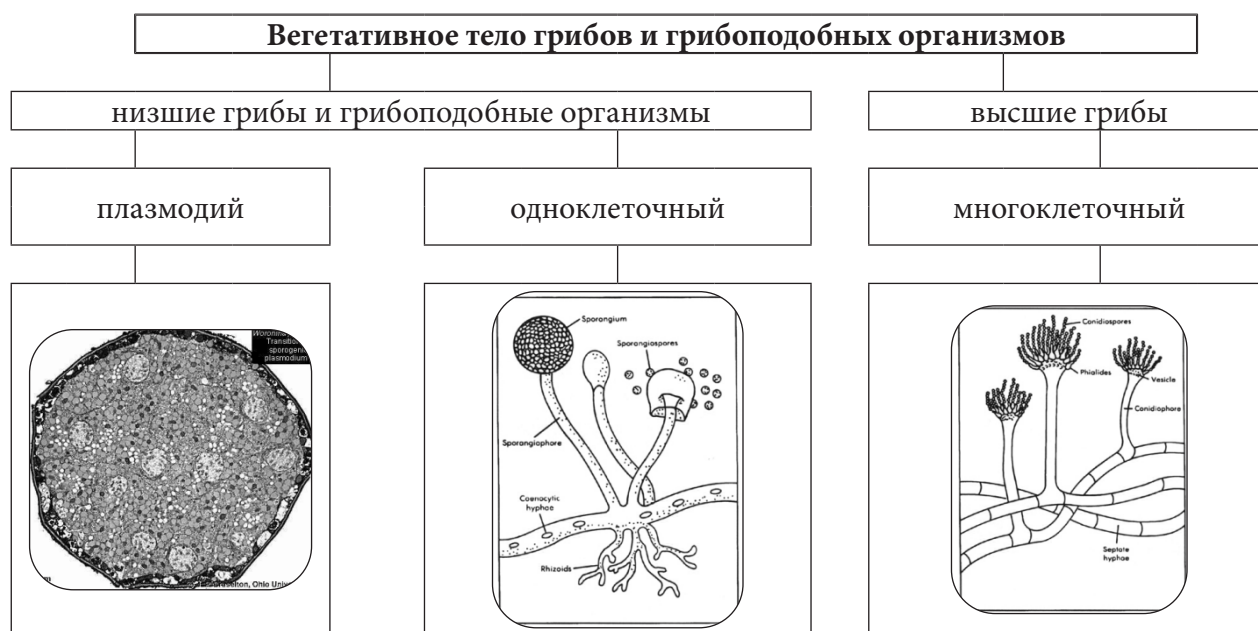


Рисунок 5-1. Морфология вегетативных тел грибов

мицелием. Некоторые представители имеют овальные или немного вытянутые клетки. Их называют дрожжами и дрожжеподобными грибами. Отличием истинных дрожжей от дрожжеподобных грибов является способность дрожжей образовывать аскоспоры (споры полового размножения), отсутствие псевдомицелия и хламидоспор. У наиболее примитивных представителей царства (миксомицетов) вегетативное тело представлено *плазмодием* – гигантской многоядерной клеткой, напоминающей амёбу.

Многим видам грибов свойственен *диморфизм*: внутри поражённых тканей они образуют дрожжеподобные клетки, а при росте на искусственной питательной среде растут как обычные мицелиальные формы.

В зависимости от строения гиф грибы делятся на высшие и низшие. У низших грибов мицелий не разделен перегородками – *септами* и представляет собой одну многоядерную клетку. Мицелий высших грибов *септированный*, т. е. многоклеточный.

У настоящих грибов (эумицетов) строение клеток характерно для всех эукариотов, однако имеются и особенности: в клетках грибов имеются структуры, называемые *сегресомы* и *хитосомы*, которые присущи только грибам. Сегресомы – вакуолеподобные структуры, ограничивающие поступление в клетку гидрофобных веществ, например углеводов. Хитосомы представляют собой органеллы, содержащие фермент хитинсинтетазу, необходимый для синтеза хитина – структурной основы клеточной стенки грибов. Есть также организмы, клеточная стенка у которых содержит не хитин, а целлюлозу. По этому признаку, а также ряду других биологических свойств (например, образованию двухжгутиковых подвижных зооспор и др.), которые объединяют их с низшими растениями, их более не рассматривают как грибы; они отнесены к царству *Chromista* и называются *грибоподобными организмами*.

Часть II. Морфология структур, формирующихся при размножении грибов

Размножаются грибы тремя путями: вегетативным (рис. 5-2), бесполом (рис. 5-3) и половым (рис. 5-4).

Бесполое размножение осуществляется при помощи спор, образующихся непосредственно на мицелии, а на особых его ветвях, отличающихся от обычных вегетативных гиф по строению и характеру роста. Процесс образования спор связан с большим расходом пластических веществ, поэтому бесполое спороношение возникает на хорошо развитом мицелии с достаточным запасом питательных веществ. Споры бесполого размножения формируются по-разному у грибов разного уровня эволюционного развития. У низших грибов споры формируются *эндогенно*: в зооспорангиях и спорангиях. Зооспоры – это подвижные (при помощи двух разных по строению жгутиков) комочки протопласта без оболочки, которые формируются внутри зооспорангиев – специальных органов спороношения примитивных форм грибов, грибоподобных организмов отдела *Oomycota* а также многих водорослей. Зоо-

спорангии формируются на концах неспециализированных гиф. Когда зооспоры созревают, оболочка зооспорангия разрывается и зооспоры выходят наружу. Такие споры нуждаются в водной среде для передвижения и прикрепления к субстрату.

У низших грибов отдела *Zygomycota*, например, плесневого гриба *Mucor mucedo*, спорангиоспоры эндогенно формируются в спорангиях, которые располагаются на концах гиф. В верхней части гифы образуется многоядерная клетка, которая отделяется поперечной перегородкой от остальной гифы. Эта клетка – будущий спорангий. В процессе роста она сильно разрастается, ядра в ней многократно митотически делятся; затем вокруг ядер обособляется протоплазма, которая одевается оболочкой и образуются неподвижные споры. После созревания спор оболочка спорангия разрывается, спорангиоспоры освобождаются и разносятся ветром.

У высших грибов споры формируются *экзогенно* на концах специализированных

Вегетативное размножение грибов и грибоподобных организмов

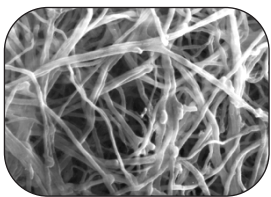
	Участками мицелия	Фрагменты мицелия многих грибов, попав на подходящий субстрат, начинают разрастаться и образуют новый таллом.
	Оидиями	Оидии , или артроспоры , образуются при распадении мицелия на отдельные клетки с тонкой оболочкой. Иногда на оидии распадается весь мицелий. По форме оидии овальные, яйцевидные. Они имеют тонкую оболочку, недолговечны
	Бластоспорами (почкованием)	Бластоспоры возникают в результате почкования гиф или спор. При этом на клетке мицелия (споре) образуется вырост, который увеличивается в размере и, после окончания роста, отделяется от материнской клетки и снова начинает почковаться. В результате формируются цепочки бластоспор, которые называют псевдомицелием .
	Хламидоспорами	Хламидоспоры образуются при распадении мицелия на отдельные клетки или комплексы клеток, покрытые плотной темной оболочкой. Благодаря такой оболочке хламидоспоры способны длительное время сохраняться при неблагоприятных условиях.
	Склероциями	Склероции – клубневидные тела различной формы и величины, состоящие из тесно сплетённых нитей мицелия и являющиеся стадией покоя для переживания неблагоприятных условий.

Рисунок 5-2. Морфология структур бесполого размножения грибов

гиф (конидиеносцах) и называются конидиями (от греч. *konía* – пылинка). На концах конидиеносцев формируются неподвижные конидии – одиночные или в цепочках. Конидии очень разнообразны по форме и могут быть одно- и многоклеточными, быть бесц-

ветными или окрашенными. Многоклеточные конидии характерны для грибов отдела *Ascomycota* и небольшого количества видов отдела *Basidiomycota*. Следует помнить, что один и тот же гриб может формировать конидии разных типов: одноклеточные

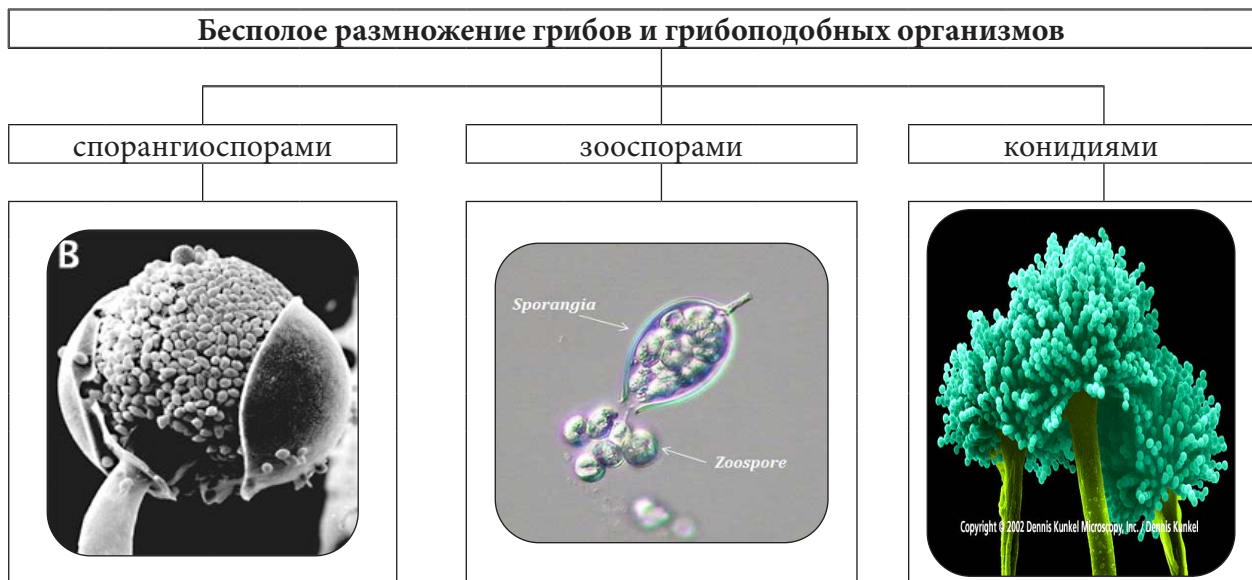


Рисунок 5-3. Морфология структур бесполого размножения грибов

микроконидии и многоклеточные макроконидии. Морфология конидиеносцев и конидий – важный признак при идентификации грибов. Конидии могут быть гаплоидными (у аскомицетов) или дикариотичными (у базидиомицетов), они служат для распространения грибов в окружающей среде и обычно гриб формирует несколько поколений конидий в течение жизненного цикла.

Деление царства грибов на отделы основано на типе полового процесса или его отсутствии. Сущность любого полового процесса – слияние содержимого двух клеток, в результате чего возникает новый организм, получивший наследственный материал от обоих родителей. Половой процесс – один из главных механизмов изменчивости у грибов. Его основное назначение в жизни грибов – появление в природе форм с новыми признаками, в том числе и патогенными. Существуют грибы, у которых половой процесс утрачен в процессе эволюции или не обнаружен при лабораторном исследовании. Такие грибы временно объединены в *формальный* (временный) отдел – *дейтеромицеты, несовершенные грибы* (*Deuteromycota, Fungi imperfecti*). Иногда, как, например, для грибов рр. *Penicillium* и *Aspergillus*, половая стадия развития уже обнаружена, они отнесены к отделу *Ascomycota*. Однако половой процесс у них протекает крайне редко и, видимо, потерял эволюционное значение. Такие

грибы по традиции всё ещё относят к отделу *Deuteromycota* и, одновременно, они заняли своё законное место среди грибов отдела *Ascomycota*. У таких грибов половая стадия развития называется *телеоморфой* а бесполовая стадия развития, относящаяся к отделу *Deuteromycota*, называется *анаморфой*.

У грибов и грибоподобных организмов имеется несколько типов полового процесса (рис. 5-4).

У большинства наиболее примитивных форм половой процесс называется *изогамией*. Он заключается в слиянии морфологически неотличимых друг от друга зооспор, выполняющих роль гамет. В результате их слияния образуется диплоидная *циста*, покаящаяся форма гриба.

У оомицетов, которые по биологии ближе к водорослям, чем к грибам, половой процесс называется *оогамией*. На мицелии формируются женская половая клетка – *оогоний* и мужская – *антеридий*. При их контакте содержимое антеридия переходит в оогоний и формируется покоящаяся *ооспора*, покрытая многослойной оболочкой. Половой процесс по типу оогамии присущ также растениям и животным.

У зигомицетов половой процесс называется *зигогамией*. Его суть заключается в следующем: на разных гифах одного и того же мицелия (такие грибы называются *гомоталличными*) или мицелиев, принадлежащих

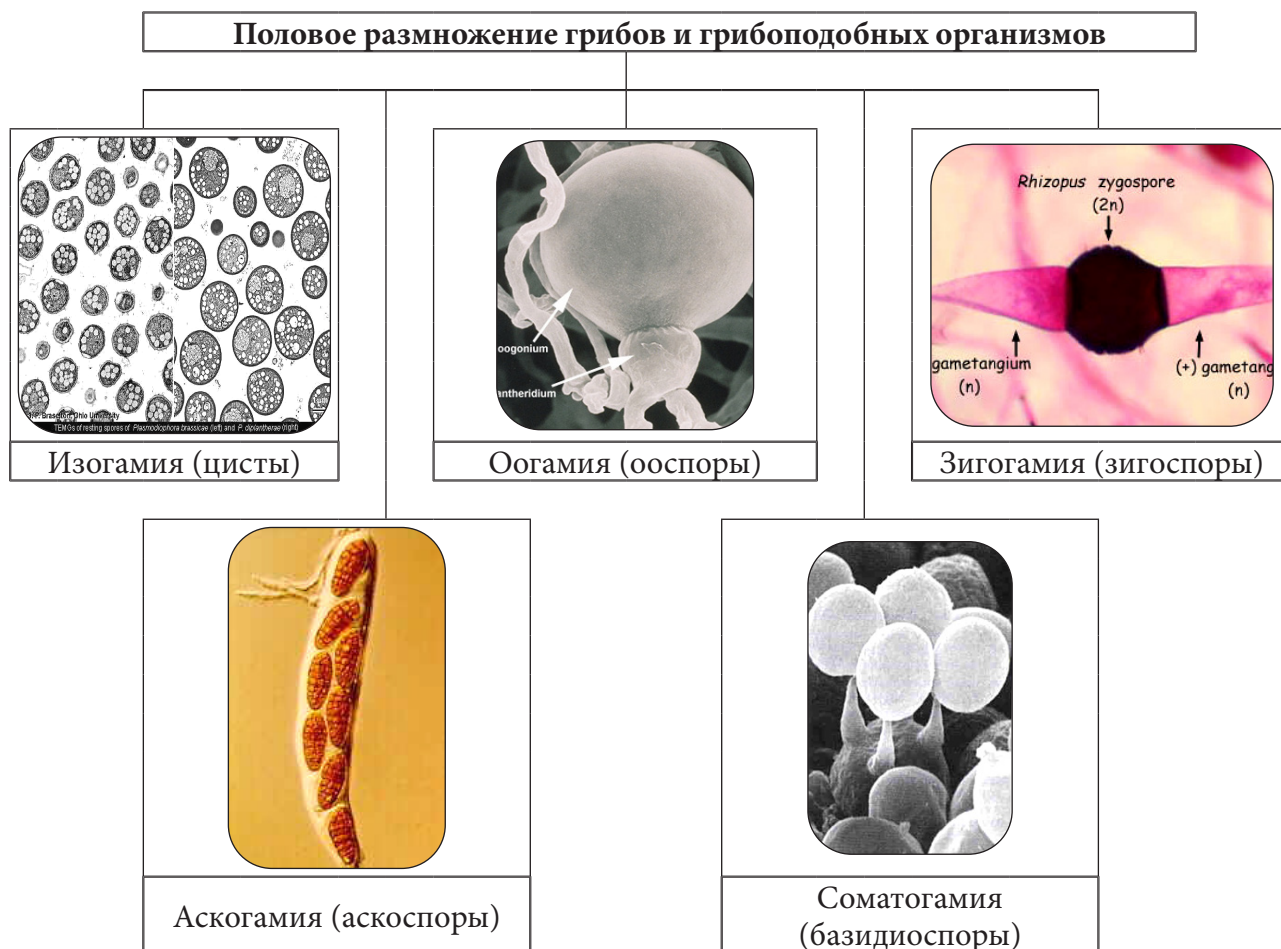


Рисунок 5-4. Морфология структур полового размножения грибов

разным особям (*гетероталлические* грибы), образуются многоядерные, неотличимые друг от друга клетки. Их иногда называют гаметангиями. При контакте двух гаметангиев между ними возникает новая клетка, в которую изливается содержимое двух гаметангиев и происходит плазмогамия и кариогамия – слияние ядер. В результате образуется *зигоспора* – покрытая многослойной оболочкой покоящаяся спора.

Как показано выше, результатом полового процесса низших грибов являются покоящиеся стадии. У высших грибов зигота не является покоящейся стадией, а продолжает развитие, результатом которого являются аскоспоры или базидиоспоры (у аско- и базидиомицетов соответственно). У таких грибов покоящаяся стадия представлена одним из способов вегетативного размножения, например склероциями у некоторых аскомицетов или телиоспорами у некоторых базидиомицетов. Половой процесс таких грибов

начинается после прорастания покоящейся формы при наступлении благоприятных условий.

У грибов отдела *Ascomycota* начало полового процесса напоминает таковой у зигомикетов: при контакте двух гиф – «женской» (*аскогона*) и «мужской» – (*антеридия*) осуществляется плазмогамия. Однако кариогамия осуществляется не сразу и существует много вариантов развития процесса, но общим является то, что в результате неоднократного деления диплоидного ядра возникает восемь гаплоидных спор, заключённых в общую оболочку – «плодовую сумку», называемую *аск* (от лат. *ascus* – мешок), поэтому раньше аскомицетов часто называли «сумчатыми грибами».

У грибов отдела *Basidiomycota* специализированные половые клетки как таковые отсутствуют. Их функции выполняют соматические клетки, поэтому этот процесс называют *соматогамией*. Большую

часть жизненного цикла гриба-базидиомицета его мицелий *дикариотичен*, т. е. в каждой его клетке находится два ядра. На верхушках гиф такого мицелия образуются структуры, называемые *базидиями*. Внутри базидии происходит кариогамия, затем диплоидное ядро дважды делится:

вначале – редуccionно, а затем, образовавшиеся гаплоидные ядра – митотически. В итоге четыре гаплоидных ядра подходят к верхушке базидии, где и отпочковываются в виде базидиоспор. Общие данные по ключевым признакам отделов грибов представлены в таблице 5-1.

Таблица 5-1

Основные признаки отделов грибов и грибоподобных организмов

Царство PROTOZOA	Царство CHROMISTA	Царство MYCOTA (FUNGI)				
Отдел PLASMODI- ORHOMY- COTA	Отдел OOMYCOTA	Отдел CHYTRIDI- OMYCOTA	Отдел ZYGOMYCO- TA	Отдел ASCOMY- COTA	Отдел BASIDIOMY- COTA	Отдел DEUTERO- MYCOTA
вегетативное тело:						
плазмодий	одноклеточ- ный мицелий	плазмодий	однокле- точный мицелий	многоклеточный (септированный) мицелий		
перегородка между клетками мицелия:						
нет	нет	нет	нет	простая	специали- зированная	простая
п о л о в о й п р о ц е с с:						
изогамия	оогамия	изогамия	зигогамия	аскога- мия	соматога- мия	отсут- ствует или не об- наружен
споры полового размножения						
цисты	ооспоры	цисты	зигоспоры	аскоспо- ры	базидио- споры	нет
споры бесполого спороношения						
зооспоры	зооспоры	зооспоры	спорангио- споры или конидии	конидии	конидиепо- добные споры	конидии или отсут- ствуют

Часть II. Обнаружение грибных структур в поражённых тканях

При микроскопическом анализе патологического материала дифференциация грибных структур и тканевых частиц представляет определённую трудность: по форме вегетативные тела грибов не всегда представлены нитевидными гифами, а могут выглядеть как неокрашенные овальные, округлые или почкующиеся тельца, которые заметить под микроскопом довольно сложно.

Реакция поражённой ткани на наличие возбудителя может быть разнообразна и, как правило, не имеет характерной карти-

ны. Разные виды возбудителей могут давать сходную гистологическую картину поражения а один и тот же вид патогена может проявлять себя по-разному, в зависимости от вирулентности штамма и сопротивляемости макроорганизма.

К настоящему времени не разработаны универсальные методы выявления грибных структур в поражённых тканях. Наиболее широкое применение нашли методы с применением лампы Вуда (рис. 5-5); в гистохимии используются реактив Шиффа,

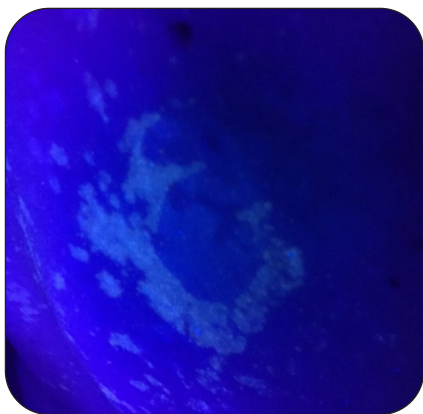


Рисунок 5-5. Свечение очагов поражения разноцветным лишаем под ультрафиолетом

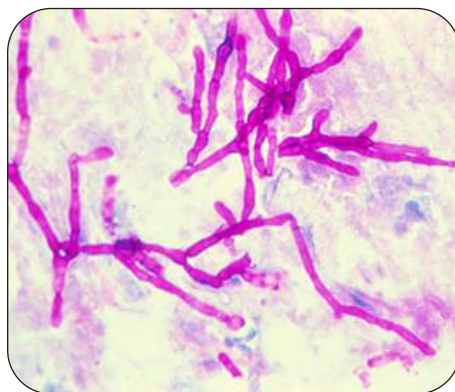


Рисунок 5-7. Псевдомицелий *Candida* sp. в отделяемом носоглотки



Рисунок 5-6. Мицелий гриба в поражённом лекарственном сырье



Рисунок 5-8. *Aspergillus fumigatus* в поражённом лёгком лошади. Хорошо заметно дихотомическое ветвление мицелия

окраска по Грам-Вейгерту, серебрение по Гомори-Крокотту. Разрабатываются методы иммуофлюоресцентной микроскопии, фазово-контрастной и поляризационной микроскопии, но они еще не нашли широкого применения.

Одним из наиболее доступных методов выявления грибных структур в тканях является ШИК-реакция (PAS-реакция), названная по используемым реактивам: Шифф-Иодная Кислота, Periodic Acid Schiff reaction.

При этой гистохимической реакции происходит окисление нейтральных полисахаридов клеточных стенок грибов иодной кислотой до альдегидов и окрашивание их фуксином, входящим в реактив Шиффа, в красный цвет. Этот метод также подходит для обнаружения друз актиномицетов.

В результате окрашивания мицелий и другие структуры грибов оказываются окра-

шены в красно-фиолетовый цвет на фоне слабо- или неокрашенных тканей (рис. 5-6, 5-7, 5-8).

Для диагностики поверхностных микозов для анализа берут ногти, кожу, волосы.

Соскоб кожи делают тупым скальпелем с периферийных участков поражения на листок бумаги, соскоб ногтей делают скальпелем или ножницами. Волосы с признаками поражения выдёргивают с корнем эпиляционным пинцетом.

Поместив волос на предметное стекло прижимают его луковицу к стеклу для лучшей фиксации препарата.

При **глубоких** микозах готовят гистологические препараты соответствующей ткани используя микротом и соответствующую технику приготовления, включающую обезвоживание ткани и заливку парафином.

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Приготовление препаратов типа «раздавленная капля» различных грибов

Для микроскопирования грибов применяют как препараты типа «раздавленная капля», так и фиксированные.

Для приготовления препаратов «раздавленная капля» в качестве монтирующей жидкости лучше использовать не воду, так как химический состав клеточной стенки определяет её плохую смачиваемость, а различные просветляющие жидкости, например лактофенол (смесь 100 г фенола, 83 мл молочной кислоты, 100 мл дистиллированной воды, 160 мл глицерина). Лактофенол хорошо проникает в препарат, удаляет из него пузырьки воздуха и делает его более прозрачным.

Порядок работы:

1. Нанесите на предметное стекло каплю лактофенола и добавьте в него небольшое количество красителя, например хлопкового синего, фуксина или пикриновой кислоты, смешайте;

2. Препаровальной иглой возьмите небольшое количество культуры гриба (иногда полезно взять и небольшое количество субстрата на котором он рос) и поместите в каплю лактофенола;

3. При помощи второй препаровальной иглы тщательно расправьте мицелий в капле;

4. Осторожно нагрейте препарат в пламени спиртовки до появления паров и дайте остыть;

5. Накройте покровным стеклом, подожгите 5 минут для лучшего окрашивания препарата и микроскопируйте при $\times 100$ а затем $\times 400$

6. По наличию или отсутствию септ определите, к высшим или низшим грибам относится данный образец

7. Найдите органы спороношения (рис. 5-9) и определите их тип (спорангии, конидиеносцы);

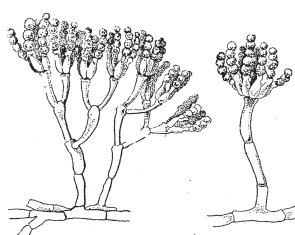
Работа с рисунками:



Плесневый гриб – **мукор**.



Плесневый гриб рода *Penicillium*



Плесневый гриб рода *Aspergillus*

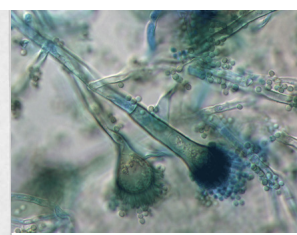
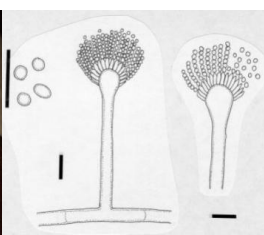


Рисунок 5-9. Различные типы бесполого спороношения грибов

8. Рассмотрите споры гриба. Если они многоклеточные, то какой предварительный

вывод о систематическом положении образца можно сделать?

Часть II. Проведение ШИК-реакции для обнаружения структур грибов

1. Приготовьте фиксированный препарат из ткани животного или растения, предположительно поражённого грибным заболеванием.

2. Нанесите на препарат 1 % водный раствор периодата калия (KIO_4) на 10 минут. Произойдёт окисление компонентов клеточной стенки грибов и гликогена с образованием свободных альдегидных групп.

3. Бережно трижды нанесите на препарат дистиллированную воду на 1-3 минуты а затем трижды – сернистую воду (0,5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ с добавлением 0,5 мл 1н HCl на каждые 10 мл раствора метабисульфита натрия), тоже на 1-3 минуты.

4. Нанесите на 30 минут на препарат реактив Шиффа (1 % водный раствор основного фуксина, обесцвеченного метабисульфитом натрия). Сразу после нанесения реактива Шиффа поместите препарат в темноту. Реактив Шиффа – фуксинсернистая кислота – реагирует с альдегидами с высвобождением свободного фуксина красного цвета.

5. Бережно трижды нанесите на препарат сернистую воду на 1-3 минуты а затем трижды – дистиллированную воду, тоже на 1-3 минуты.

6. Желательно провести контрокрашивание препарата 0,1 % раствором красителя лихтгрюн (светло-зелёный) в течение 15 секунд.

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. Шевченко

Медицинский факультет
Кафедра биологии и физиологии человека

В.В. Власов, Е.Б. Бушева

РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Часть I «МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»

студента _____ группы

Ф.И.О. _____

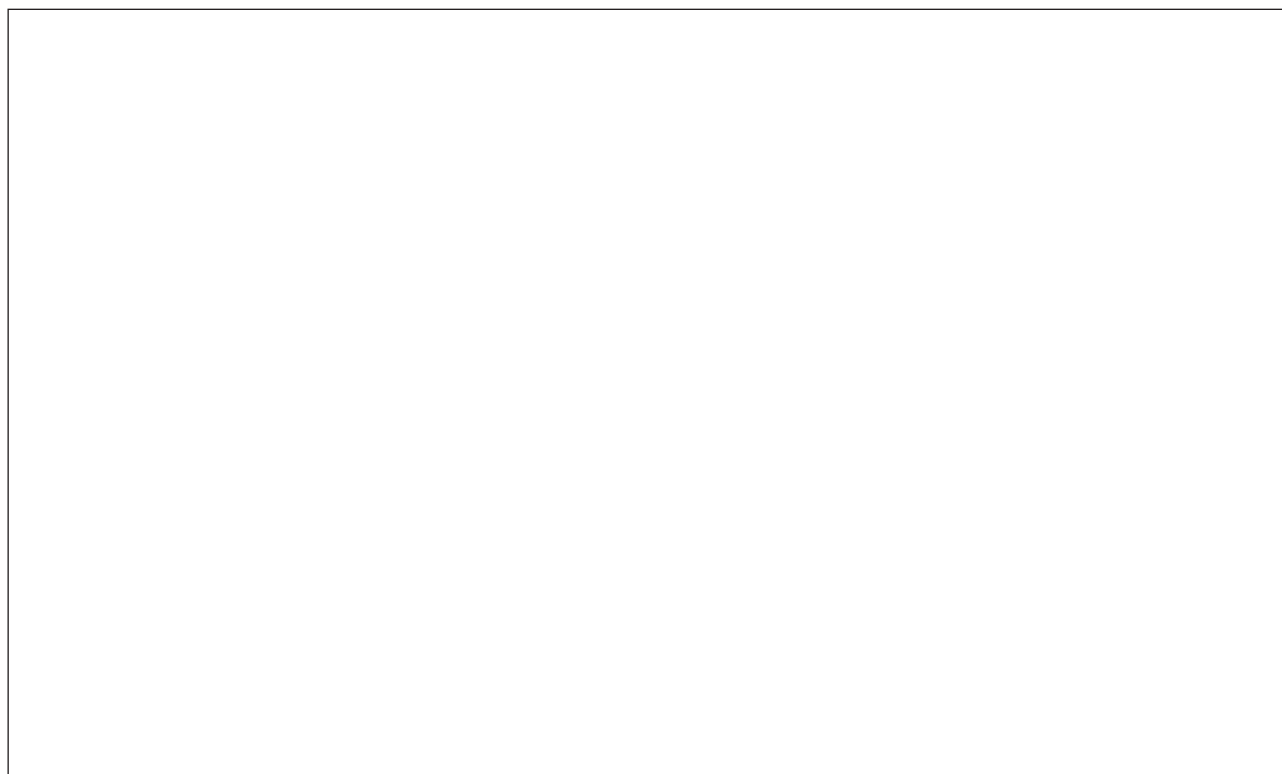
Рабочая тетрадь переплетается или подписывается каждый лист

Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 1
«Устройство микробиологической лаборатории.
Микроскопический метод изучения микроорганизмов»

Задание I. Приготовьте нативный препарат клеток дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*

Запишите порядок действий по приготовлению препарата из теоретической части	
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	

Результат микроскопирования нативного препарата клеток дрожжевых грибов (рисунок или микрофотография):



Задание II. Приготовьте фиксированный препарат смеси бактерий и дрожжей:

Запишите порядок действий по приготовлению препарата из теоретической части	
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Результат микроскопирования фиксированного препарата смеси бактерий и дрожжей (рисунок или микрофотография):

Задание III. Зарисуйте основные морфологические группы бактерий:

Морфологическая группа	
монокocchi (микрококки)	
диплококки	
тетракокки	

Морфологическая группа	
стрептококки	
стафилококки	
сарцины	

Морфологическая группа	
бактерии	
диплобактерии	
стрептобактерии	

Морфологическая группа	
бациллы	
стрептобациллы	
клостридии	

Морфологическая группа	
вибрионы	
спириллы	
спирохеты	

Морфологическая группа	
кампилобактерии	
постоянные нити	
временные нити	

Задание IV. Прочтите теоретическую часть и заполните таблицу:

Наименование прибора, инструмента	Назначение
Автоклав	
Сухожаровой шкаф	
Ламинарный бокс	
Центрифуга	
Термостат	
Анаэростат	
Водяная баня	
Чашки Петри	
Пробирки	

Наименование прибора, инструмента	Назначение
Предметные стёкла	
Микробиологические петли	

Задание V. Заполните таблицу по видам световой микроскопии

Название	Сущность метода	Применение
Микроскопия с иммерсией		
Люминесцентная микроскопия		
Фазово-контрастная микроскопия		
Темнопольная микроскопия		

Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 2
«Классификация, морфология и строение бактерий.
Окраска по Граму»

Задание I. Используя методические указания заполните таблицу:

Тип клеточной стенки	Толщина, сложность	Основные структурные компоненты
Грамположительный		
Грамотрицательный		

Задание II. Зарисуйте схемы строения разных клеточных оболочек бактерий

<i>A – простая мембрана Mycoplasma pneumoniae</i>

Б – Клеточная стенка грамположительной бактерии

В – клеточная стенка грамотрицательной бактерии

Задание III. Заполните таблицу «Принцип окраски по Граму»

Этап		Вид препарата под микроскопом
I		
II		
III		

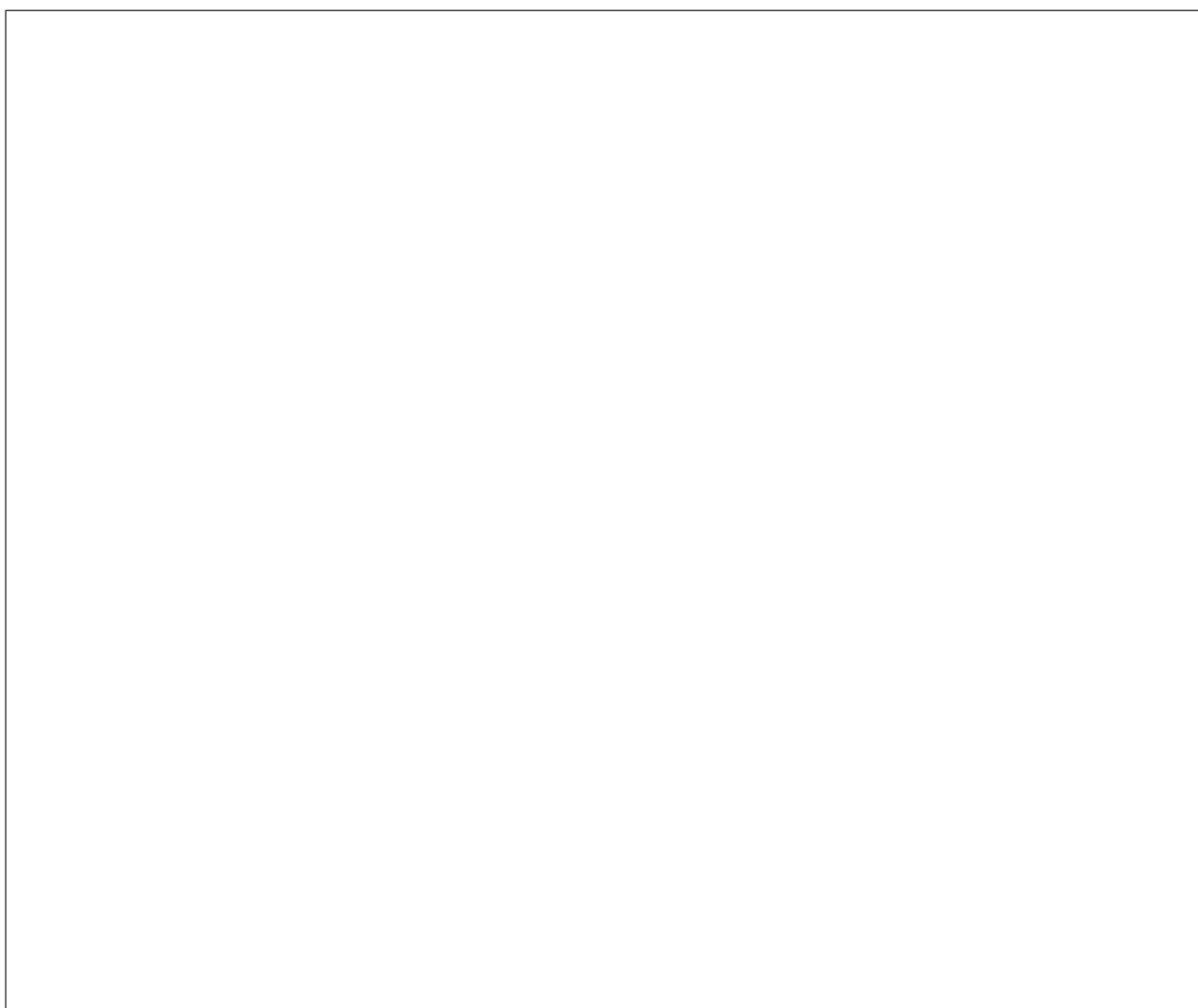
Этап		Вид препарата под микроскопом
IV		
V		

Задание IV. Окрасьте препарат по Граму

Запишите порядок действий по приготовлению препарата из теоретической части (записывайте тот метод, который используете)	
1.	
2.	
3.	

4.	
5.	
6.	
7.	

Результат микроскопирования препарата, окрашенного по Граму (рисунок или микрофотография):



Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 3

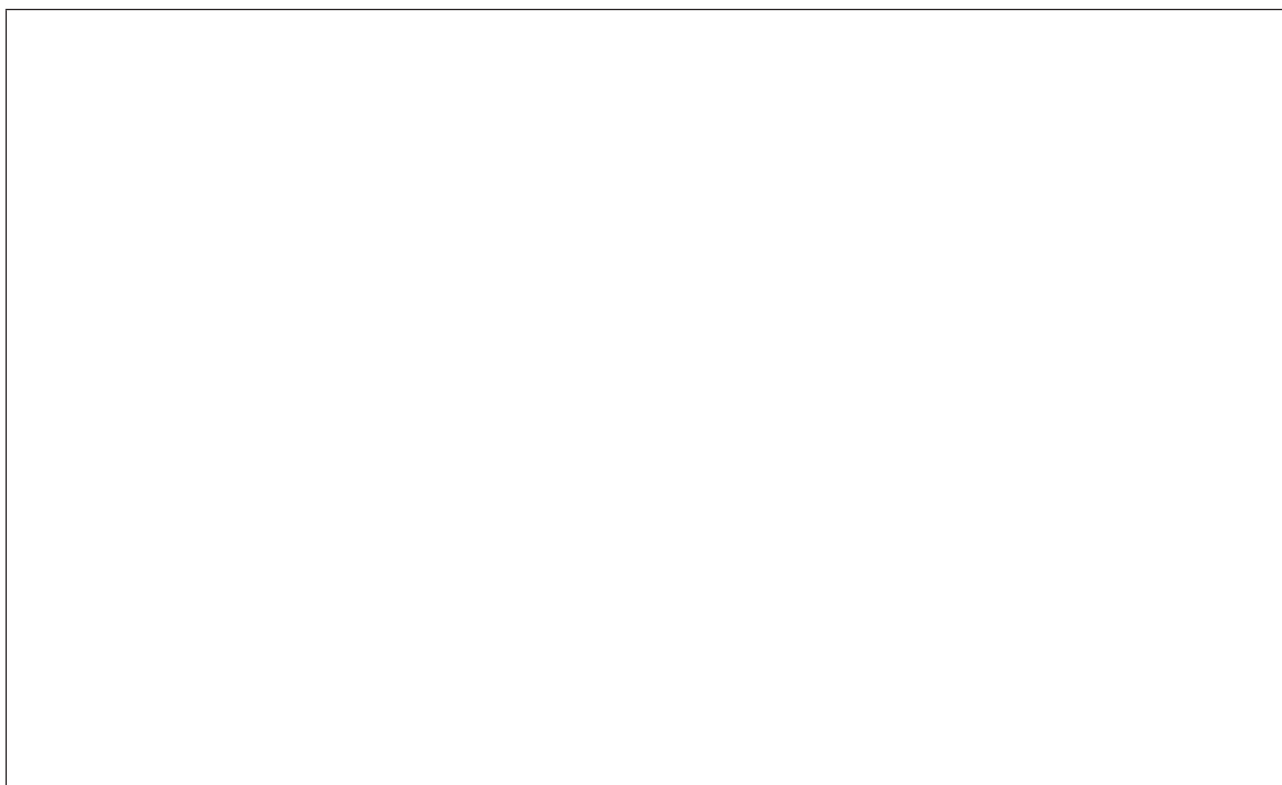
«Морфология и строение групп микробов. Методы обнаружения капсул бактерий»

Задание I. Окрасьте препараты по Бурри-Гинсу и Баху-Дрободько:

Запишите порядок действий по приготовлению препарата по Бурри-Гинсу из теоретической части	
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	

Запишите порядок действий по приготовлению препарата по Баху-Дрободько из теоретической части	
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Результат микроскопирования капсул (рисунок или микрофотография, укажите использованный метод окрашивания):



Задание II. Заполните таблицу по методам окрашивания

Метод	Цель	Используемые красители, реактивы	Результат окрашивания (рисунок из методички или атласа)
Нейссера			
Ожешко (Пешкова)			

Метод	Цель	Используемые красители, реактивы	Результат окрашивания (рисунок из методички или атласа)
Циля-Нильсена			
Здродовского			
Романовского-Гимзы			

Задание III. Зарисуйте типы жгутикования бактерий

Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 4
«Обнаружение эндоспор бактерий. Морфология вирусов»

Задание I. Используя теоретическую часть заполните схему «Устойчивость спор»:

Стойкость спор к условиям окружающей среды обеспечивается при помощи:	

Задание II. Используя теоретическую часть заполните схему «Типы расположения эндоспор»:

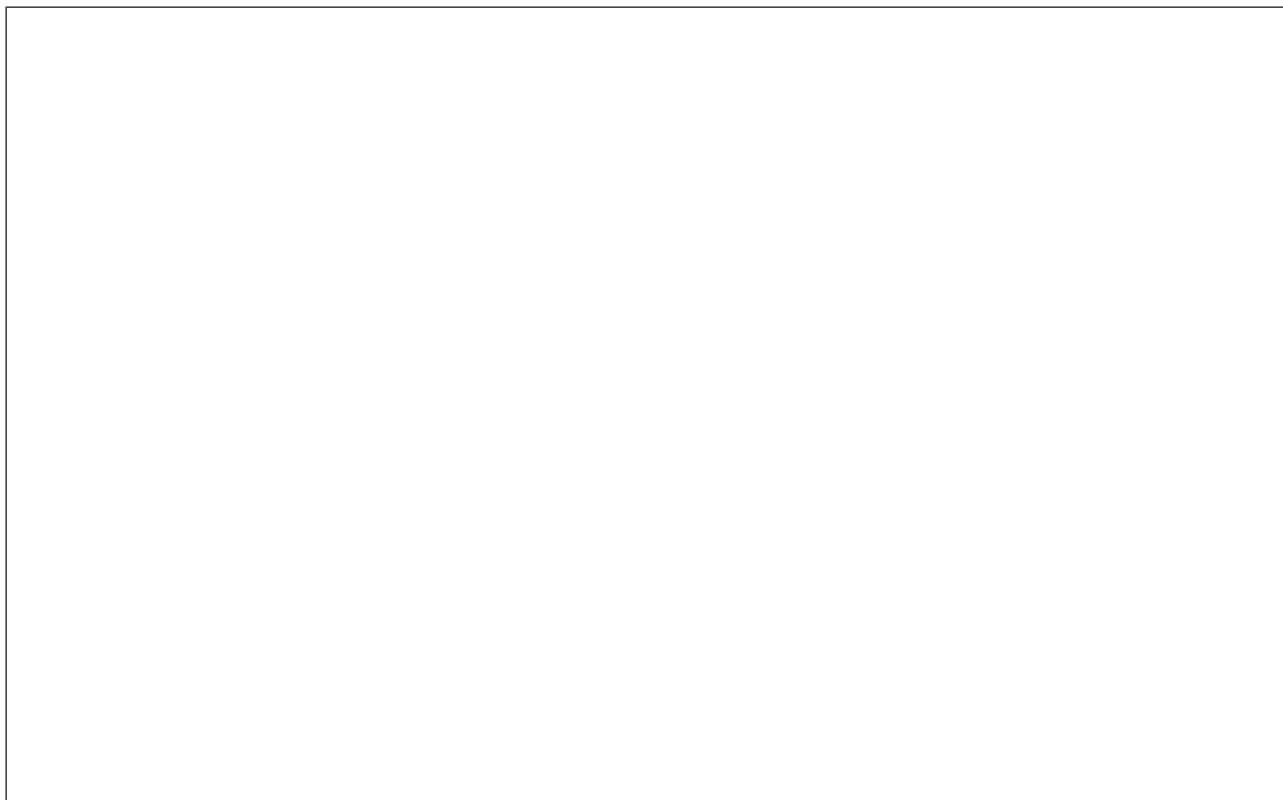
Форма и расположение спор у бактерий	

Задание III. Проведите окрашивание по Шефферу-Фултону

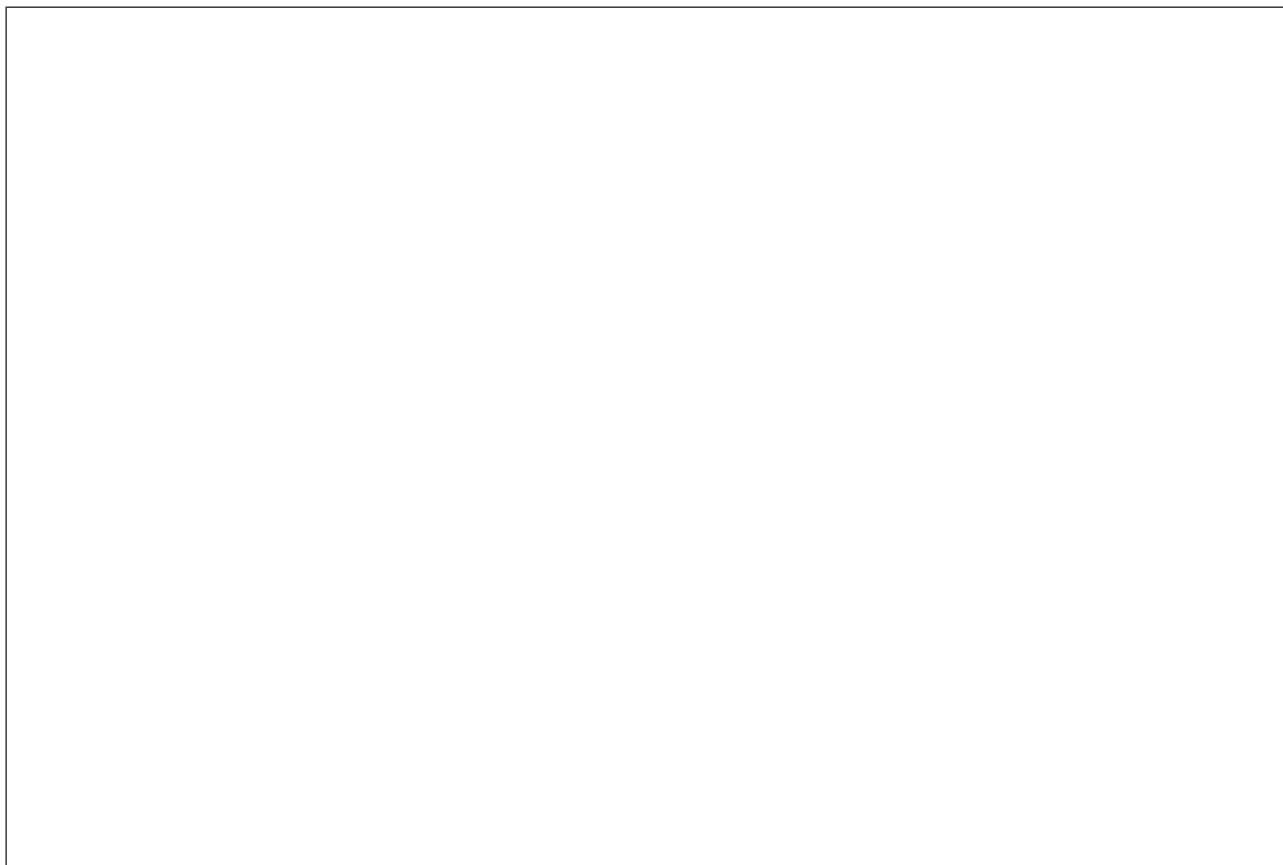
Запишите порядок действий по приготовлению препарата по Шефферу-Фултону (с бриллиантовым зелёным) из теоретической части	
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	

Результат микроскопирования капсул (рисунок или микрофотография, укажите использованный метод окрашивания):

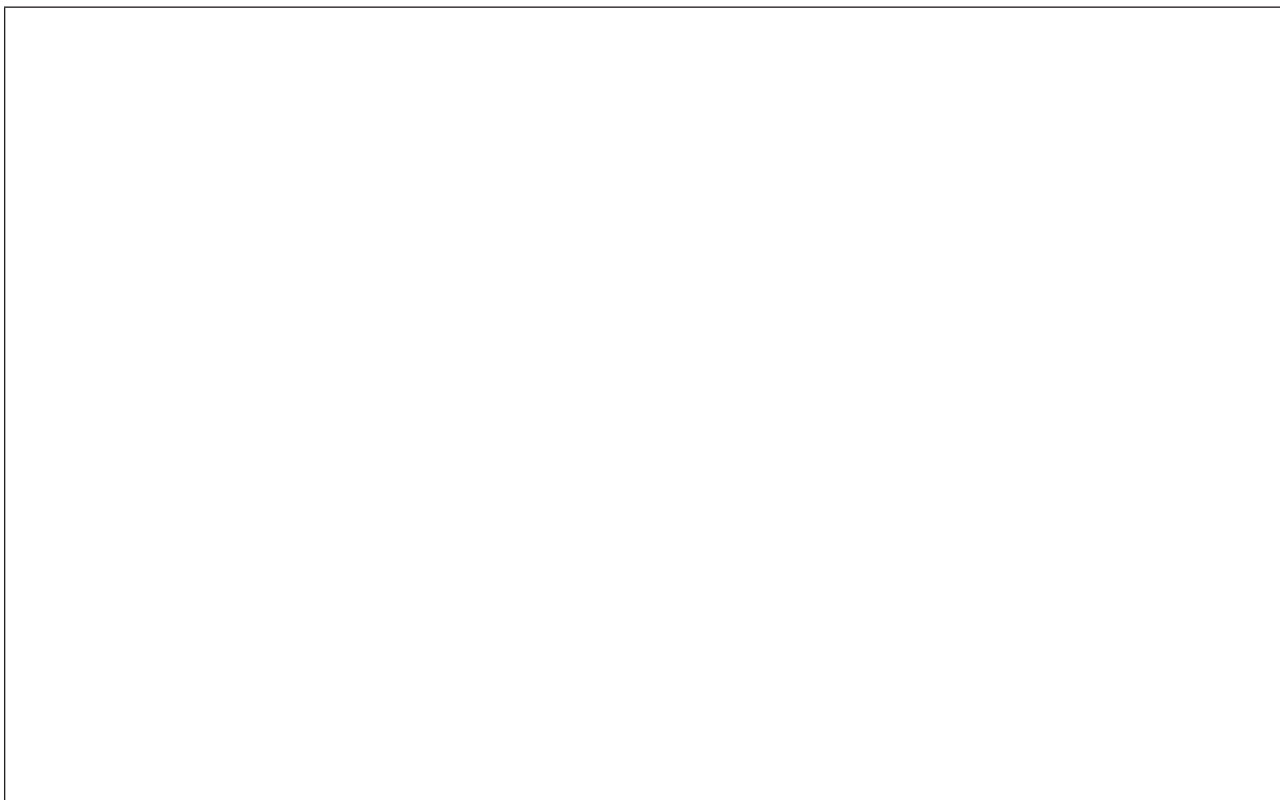
Задание III. Зарисуйте схему строения безоболочечного (простого) вируса



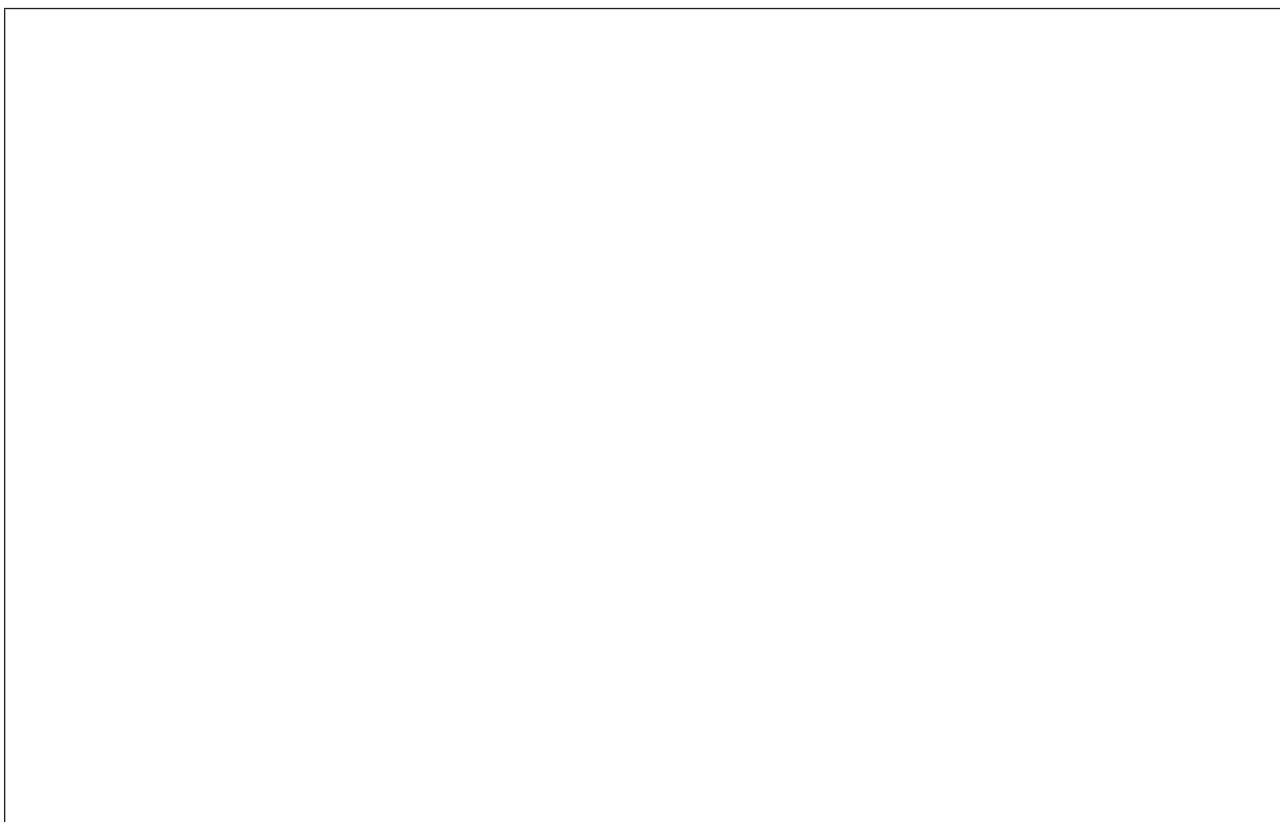
Задание IV. Зарисуйте схему строения оболочечного (сложного) вируса



Задание V. Зарисуйте схему строения бактериофага



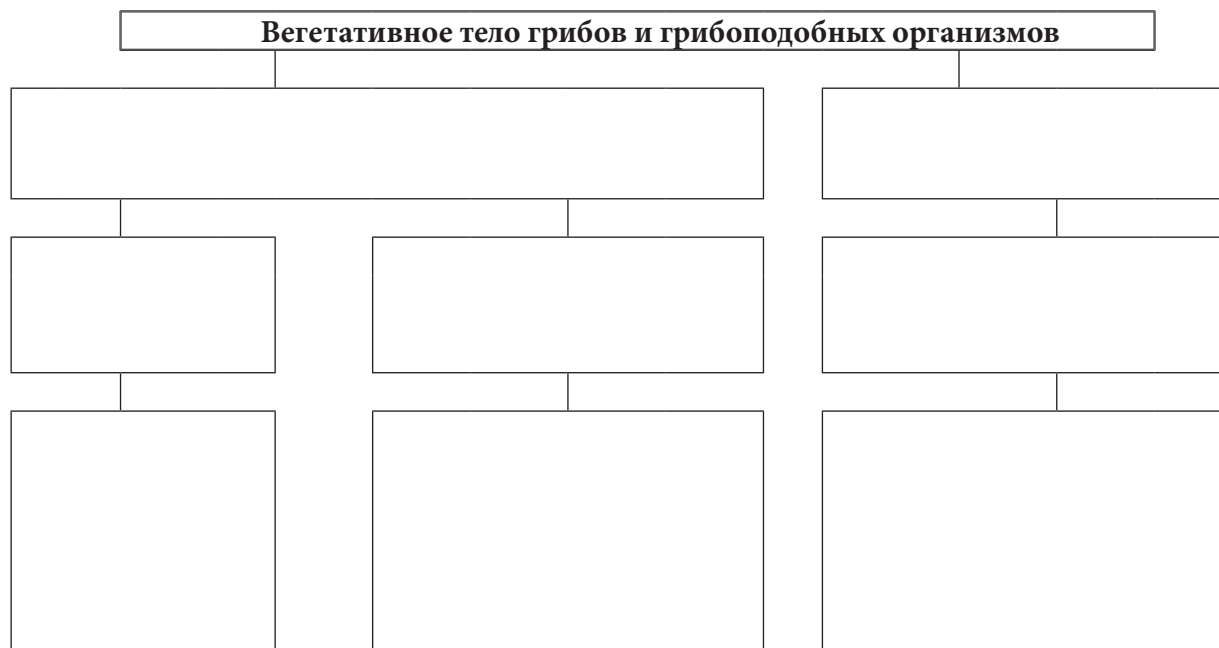
Задание VI. Зарисуйте результат окрашивания вирусных включений в клетках серебрением



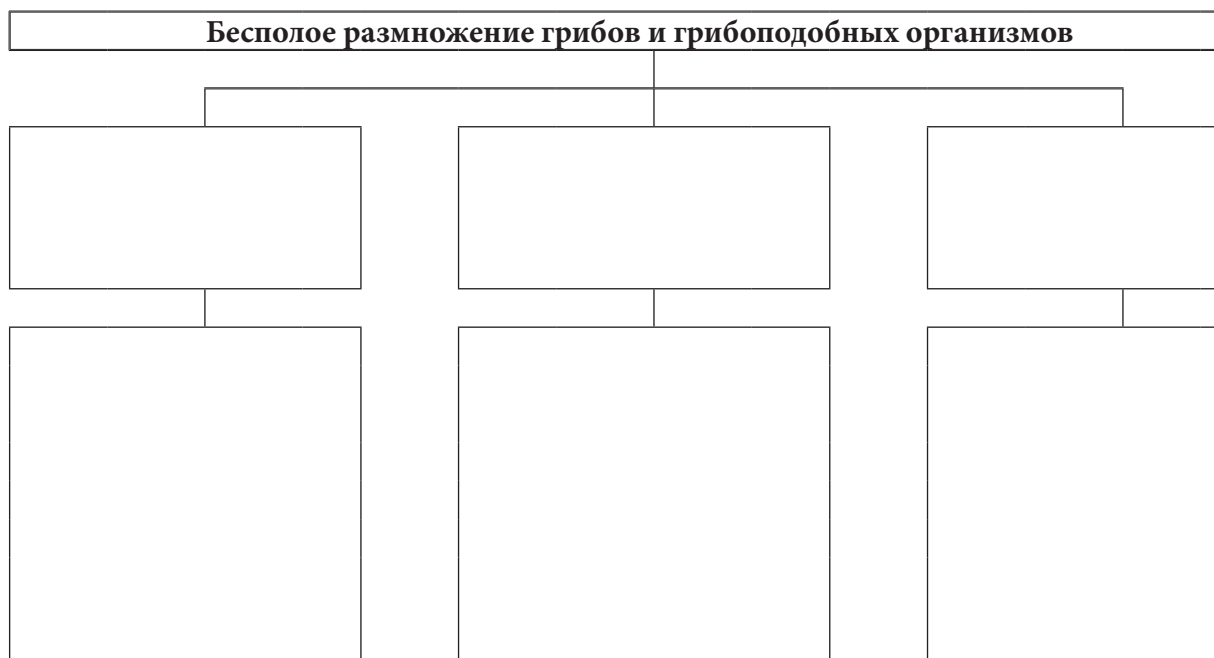
Лист рабочей тетради к лабораторной работе № 5

«Морфология и систематика грибов»

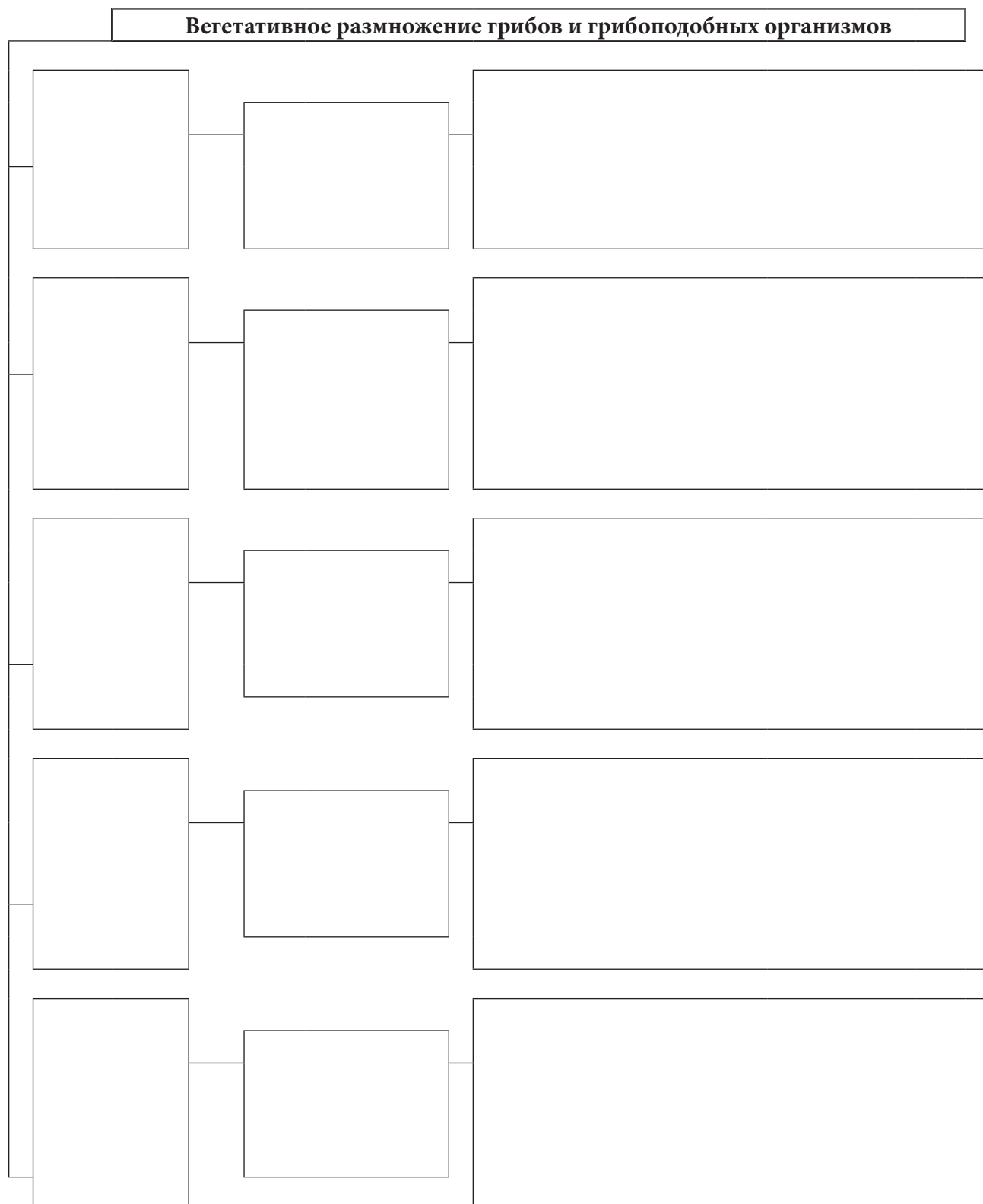
Задание I. Используя теоретическую часть заполните схему «Вегетативное тело грибов»:



Задание II. Используя теоретическую часть заполните схему «Бесполое размножение грибов»:



Задание III. Используя теоретическую часть заполните схему «Бесполое размножение грибов»:



[illegible]

Задание V. Приготовьте препарат гриба по типу «раздавленная капля»

Запишите порядок действий по приготовлению препарата гриба по типу «раздавленная капля» из теоретической части	

Результат микроскопирования капсул (рисунок или микрофотография, укажите использованный метод окрашивания):

--

Список использованной литературы:

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с: ил.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов. – 5-е изд., испр. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2016. – 792 с.: ил.
3. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С., Федорова З.Ф. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Под ред. Л. Б. БОРИСОВА. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина. 1984. – 256 с., ил.
4. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология: Учебник. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с: ил.
5. Еремина И.А., Кригер О.В. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. – Кемерово, 2005. – 112 с.
6. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: «Медицина», 1978. – 387 с.
7. Лабораторная диагностика малярии и бабезиозов: Методические указания. – М.: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора. – 43 с.
8. Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология [Электронный ресурс] / У. Левинсон ; – Эл. изд. – Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 1184 с.). – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
9. Литусов Н.В. Род *Rickettsia*. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2017. – 35 с.
10. Павлович С.Л., Пяткин К.Д. Медицинская микробиология: Практикум. – Мн.: Выш. шк., 1993. – 200 с.: ил.
11. Приказ МЗ РФ от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
12. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С., Современная ботаника. – М.: Мир, 1990.
13. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. Под ред. К.И. Матвеева, М.И. Соколовой. – М., 1964. – С. 49–57.
14. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю. Выявление микобактерий методом микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену. Вестник ЦНИИТ, 2019, № 1, С. 100–108. DOI: 10.7868/S258766781901011
15. Современная классификация микроорганизмов. Домены: Bacteria, Archaea, Eukaria. [Электронный ресурс] : URL: <https://studfiles.net/preview/5621925/page:4/>
16. Сопрунова О.Б. Санитарная микробиология: Учебное пособие / АГТУ. – Астрахань, 2007. – 204.
17. Степанюк В.В. Окраска бактерий по Граму: современная оценка, причины грам-вариабельной окраски. Микробиол. журн. 1990; 52:5:97 – 106 с.
18. Структура бактериофага. Справочник. [Электронный ресурс] : URL: <https://www.pesticidy.ru/dictionary/Bacteriophage>
19. Техника безопасности и правила работы в микробиологической лаборатории [Электронный ресурс] : URL: <https://studopedia.org/14-84927.html>
20. Хилькевич Н.Д. Модификации контрастной окраски по Граму в бактериоскопической и культуральной диагностике гонореи. Вестник дерматологии и венерологии, N 6-1998, С. 26–28.
21. Царев В.Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 576 с.

22. Baig, Akeel & Sandhu, Bhupinder & Singh, ck & Bansal, K. & Sood, Naresh. (2014). Histopathological analysis of nervous tissue in rabid buffaloes. *Journal of Animal Science Advances*. 4. 732-738.
23. Baker F.J., Breach M.R. *Medical microbiological techniques*. London 1980;13,14,504,507.
24. Heimbrook, M. E., Wang, W. L., & Campbell, G. (1989). Staining bacterial flagella easily. *Journal of clinical microbiology*, 27(11), 2612–2615. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.11.2612-2615.1989>
25. Introduction to Viruses. [Электронный ресурс] : URL: <https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/introduction-viruses>
26. Lumb R., Van Deun A., Bastian I., Fitzgerald M. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. *GLI*, 2013, 84 p.
27. Positive CP control *S. aureus* isolate (H7) stained by modified Maneval's capsule staining method [Электронный ресурс] : URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/jmm/10.1099/jmm.0.077024-0.f2>
28. Relapsing Fever. Information for Clinicians. [Электронный ресурс] : URL: <https://www.cdc.gov/relapsing-fever/clinicians/index.html>
29. Sandor E. Karpathy, Kimetha S. Slater, Cynthia S. Goldsmith, William L. Nicholson, Christopher D. Paddock. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia associated with multiple species of Amblyomma ticks in North, Central and South America. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* Volume 66, Issue 12. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001502>
30. Smith A., Bruton J. *A color atlas of histological staining techniques*. London 1978;129 – 130.
31. *Trichomonas vaginalis*. MCDI Image Library. [Электронный ресурс] : URL: https://mcdinternational.org/trainings/malaria/english/dpdx5/html/ImageLibrary/S-Z/Trichomoniasis/body_Trichomoniasis_ill
32. What are viruses? [Электронный ресурс] : URL: <https://pt.slideshare.net/expertsmindedu/what-are-viruses-18673486/7?smtNoRedir=1>

Учебное издание

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
Лабораторный практикум

Власов Вадим Вячеславович,
Бушева Елена Борисовна

Издается в авторской редакции

Формат 60х84/8. Усл. печ. л. 9,5.

Опубликовано на Образовательном портале ПГУ им. Т.Г. Шевченко
<http://moodle@spsu.ru>