

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО

Кафедра ботаники и экологии

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

ЧАСТЬ 1: Систематика и морфология микроорганизмов

Методические рекомендации

Тирасполь, 2021

УДК 579(07)(075)

ББК 28.4 р3я 73

М 54

Составители:

Е.Б. Бушева, ст. преп.

Т.И. Богатая, преп.

Рецензенты:

С.А. Сокова, канд. биол. наук, доцент

М.В. Капитальчук, канд. биол. наук, доцент

Лабораторные работы по микробиологии. Ч. 1. Систематика и морфология микроорганизмов: методические рекомендации / сост. Е.Б. Бушева, Т.И. Богатая. – Тирасполь, 2021. – 50 с.

Содержит как теоретический материал, так и материал для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология и вирусология». Помимо этого, в него входят тесты для самоподготовки студентов. Теоретический материал и лабораторные занятия подобраны и методически распределены в соответствии с программой подготовки биологов. Руководство включает раздел «Систематика и морфология микроорганизмов», содержащий 3 лабораторных занятия по разным темам данного раздела. В теоретической части дается описание классификации микроорганизмов, морфологии и строения прокариот и специфических групп микроорганизмов. В практической части представлены методы приготовления микробиологических препаратов, различных способов окраски микроорганизмов и техники микроскопирования для изучения их морфологии.

Рассчитано на студентов биологических специальностей учебных заведений, а также может быть полезным для преподавателей дисциплины «Микробиология».

УДК 579(07)(075)

ББК 28.4 р3я 73

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

ВВЕДЕНИЕ

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

Изучение каждой темы начинается с теоретической части, в которую включены тезисы лекций, а также вспомогательные материалы в виде пояснительных таблиц и схем для записи в рабочую тетрадь. Далее следуют тесты для самоподготовки. Затем идет практическая часть, содержащая информацию о проведении соответствующей лабораторной работы.

Каждая лабораторная работа начинается с цели лабораторного занятия, за которой следуют описательная часть, оснащение и сам ход выполняемой работы. Затем дается программа лабораторного занятия, включающая домашнее задание для подготовки, а именно, задание для самостоятельной работы по заполнению рабочей тетради и перечень вопросов для теоретической подготовки. Следом идет рабочее задание, содержащее описание того, что необходимо выполнить непосредственно на лабораторном занятии, и пояснения к тому, что должно содержаться в альбоме. Также прилагаются рисунки и образцы таблиц как пример заполнения альбома.

В конце пособия дается образец оформления альбома.

Теоретический материал дает возможность закрепить и конкретизировать знания студентов о разнообразии, классификации, формах и строении микроорганизмов. Практическая часть работы обеспечивает получение определенных навыков выполнения микробиологических исследований, в частности приготовления микробиологических препаратов с применением различных способов окрашивания и микроскопирования с иммерсией, а также повышает ответственность за правильное выполнение лабораторных заданий.

Методическое руководство предназначено для студентов биологических специальностей учебных заведений, а также может использоваться преподавателями дисциплины «Микробиология».

Данная информация также может быть полезна для учителей средних школ, как методический материал для более углубленного изучения предмета биологии или проведения факультативных занятий.

Раздел 1.

СИСТЕМАТИКА И МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема 1. ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ. КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вопросы для самоподготовки к занятию № 1.

«Микроскопический метод исследования. Микроскопия с иммерсией»

1. Устройство светового микроскопа.
2. Виды световой микроскопии – суть.
3. Правила работы с иммерсией.
4. Принципы систематики бактерий
5. Классификация бактерий.
6. Особенности классификации вирусов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Понятие о микробиологии.

Микробиология – это наука, изучающая специфику классификации, морфологию и строение, особенности физиологии, биохимии и генетики, экологию, распространение и роль в природе, значение микроорганизмов в хозяйственной деятельности человека и для его здоровья. Микроорганизмы (микробы) – это организмы, невидимые невооруженным глазом из-за их малых размеров. Этот критерий – единственный, который их объединяет. В остальном мир микроорганизмов еще более разнообразен, чем мир макроорганизмов.

Микроорганизмы есть во всех 5 Царствах нашей природы. Есть микроскопические животные (простейшие), растения (некоторые водоросли), грибы (плесени и дрожжи). Но традиционно в учебном курсе микробиологии рассматриваются бактерии и вирусы.

Микробиология как наука имеет свою историю формирования и развития, в которой условно можно выделить 5 этапов.

В настоящее время – это одна из фундаментальных биологических наук, обладающая широким арсеналом методов исследования. Специфическими для микробиологии являются следующие методы:

- микроскопический;
- микробиологический (метод культивирования микробов);
- биологический (метод заражения чувствительных макроорганизмов);
- серологический (метода, основанный на специфических реакциях антиген-антитело).

Наука включает в себя обширные разделы общей (теоретической) микробиологии, частной микробиологии (связанной с определенными свойствами определенных групп микробов) и прикладной микробиологии (связанной с использованием микробов в жизнедеятельности человека).

2. Принципы систематики микробов.

Систематика – распределение микроорганизмов в соответствии с их происхождением и биологическим сходством. Систематика занимается всесторонним описанием **видов** организмов, выяснением степени родственных отношений между ними и объединением их в различные по уровню родства классификационные единицы – **таксоны**.

Таксономия – наука о методах и принципах распределения (классификации) организмов в соответствии с их иерархией. Наиболее часто используют следующие таксономические единицы (таксоны) – **штамм, вид, род**. Последующие более крупные таксоны – **триба, семейство, порядок, класс, отдел, подцарство, царство, империя**.

В систематике прокариот используется несколько основных видов таксономии:

1. **Нумерическая (численная) таксономия** основывается на использовании максимального количества сопоставляемых признаков и математическом учете степени соответствия.

При изучении, идентификации и классификации микроорганизмов чаще всего изучают следующие (фено- и генотипические) характеристики:

1) морфологические – форма, величина, особенности взаиморасположения, структура, тинкториальные свойства (отношение к

различным красителям – характер окрашивания, прежде всего к **окраске по Граму**);

2) физиологические – культуральные (характер роста микроорганизма на питательных средах), способы углеводного (**автотрофы, гетеротрофы**), азотного (**аминоавтотрофы, аминокетотрофы**) и других видов питания, тип дыхания (**аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы**).

3) биохимические – способность ферментировать различные *субстраты* (углеводы – сахаролитические свойства, белки и аминокислоты – протеолитические свойства и др.), образовывать в процессе жизнедеятельности различные биохимические продукты за счет активности различных ферментных систем и особенностей обмена веществ;

4) молекулярно-биологические – особенности структуры нуклеиновых кислот, например, % ГЦ пар.

2. Серотаксономия проводится по антигенным свойствам, зависящим преимущественно от химического состава и строения клеточной стенки, жгутиков, капсулы. Антигены микробов распознаются по способности макроорганизма (хозяина) вырабатывать против них антитела и другие формы иммунного ответа, выявляются в иммунологических реакциях.

3. Хемотаксономия – осуществляется по химическому составу клеточных стенок (основные сахара и аминокислоты, липидный и жирнокислотный состав), белковому спектру (полипептидный профиль).

4. Генотаксономия – основывается на генотипических признаках. В последние десятилетия все более широко и эффективно используются различные генетические методы (изучение генотипа). Используются все более совершенные методы – рестрикционный анализ, ДНК – ДНК гибридизация – метод молекулярных зондов, ПЦР, сиквенс и др. В основе большинства методов лежит принцип определения степени гомологии генетического материала (ДНК, РНК). При этом чаще исходят из условного допущения, что степень гомологии более 60 % (для некоторых групп микроорганизмов – 80 %) свидетельствует о принадлежности микроорганизмов к одному виду, 40–60 % – к одному роду.

3. Классификация и номенклатура прокариот.

Классификация – распределение (объединение) организмов в соответствии с их общими свойствами (сходными генотипическими и фенотипическими признаками) по различным таксонам.

Согласно современной систематике, микроорганизмы относятся к двум империям и одному царству:

Империи:

Eucariotae – к ним относятся простейшие и грибы;

Procariotae – к ним относятся цианобактерии и истинные бактерии

Царство:

Vira – к нему относятся вирусы;

Основные отличия прокариот от эукариот состоят в том, что прокариоты не имеют:

1. морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является располагающийся в цитоплазме нуклеоид;

2. системы внутриклеточных органоидов (аппарата Гольджи; эндоплазматической сети; митохондрий и др.).

3. не делятся митозом и мейозом

По одной из классификаций, принятой в систематике прокариот выделяют 2 Царства: бактерии и архебактерии. Царство бактерии включает в себя 2 Подцарства: зубактерии и цианобактерии. Кроме того, в зависимости от наличия и особенностей структуры клеточной стенки определены 4 Отдела:

- Firmicutes («твердокожие») или грамположительные бактерии;

- Gracilicutes («тонкокожие») или грамотрицательные бактерии;

- Tenericutes («нежнокожие») или бактерии без клеточной стенки;

- Mendosicutes («неправильнокожие») или бактерии с измененной клеточной стенкой.

Основные фено- и генотипические характеристики, используемые для классификации микроорганизмов, используются и для идентификации, т. е. *установления их таксономического положения и прежде всего видовой принадлежности*. В современном представлении вид в микробиологии – совокупность микроорга-

низмов, имеющих общее эволюционное происхождение, близкий генотип (высокую степень генетической гомологии, как правило более 60 %), максимально близкие фенотипические характеристики и проявляющие в **стандартных** условиях качественно определенные свойства.

Есть внутривидовая таксономическая категория – вар (вариант). Микроорганизмы одного вида, различающиеся по антигенным характеристикам, называют **серовариантами** – сокращенно **сероварами**), по чувствительности к специфическим фагам – **фаговарами**, биохимическим свойствам – **хемоварами**, по биологическим свойствам – **биоварами**, по биохимической активности – **ферментоварами**, по устойчивости к антибиотикам – **резистентоварами** и т. д.

Номенклатура – название микроорганизмов в соответствии с международными правилами. Также как для растений и животных, для названия микроорганизмов применяется бинарная латинская номенклатура род/вид, состоящую из названия рода (пишется с заглавной буквы) и вида (со строчной буквы). Но если видовую принадлежность исследователям определить не удастся и определена только принадлежность к роду, то употребляется термин «species». Название рода обычно или основано на морфологическом признаке соответствующего микроорганизма (например, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*) либо являются производными от фамилии автора, который открыл или изучил данный возбудитель (например, *Neisseria*, *Shigella*, *Escherichia*, *Rickettsia*, *Gardnerella*).

Видовое название часто связано с наименованием основного вызываемого этим микроорганизмом заболевания (например, *Vibrio cholerae* – холеры, *Shigella dysenteriae* – дизентерии, *Mycobacterium tuberculosis* – туберкулеза) или с основным местом обитания (например, *Escherichia coli* – кишечная палочка).

Кроме того, в русскоязычной медицинской литературе возможно использование соответствующего русифицированного названия бактерий (например, вместо *Staphylococcus epidermidis* – эпидермальный стафилококк; *Staphylococcus aureus* – золотистый стафилококк и т. д.). Чаще всего это имеет место при идентификации микроорганизмов, имеющих нетрадиционные пищевые потребности или условия существования.

В микробиологии часто используется и ряд других вне таксономических терминов для характеристики групп микроорганизмов.

Штамм – любой конкретный образец (изолят) данного вида. Это совокупность микробов одного вида, выделенных из разных источников или из одного источника в разное время. Штаммы могут различаться по некоторым признакам, не выходящим за пределы характеристики вида.

Колония – видимая изолированная структура при размножении бактерий на плотных питательных средах, может развиваться из одной или нескольких родительских клеток. Если колония развилась из одной родительской клетки, то потомство называется **клон**.

Культура – вся совокупность микроорганизмов одного вида, выросших на плотной или жидкой питательной среде.

4. Особенности классификации вирусов.

Вирусы отнесены к царству *Vira*. В Царстве *Vira* выделяют семейства, название которых оканчивается на «-viridae»; подсемейства с окончанием названия на «-virinae»; роды с окончанием названия на «-virus» и виды, которым дается тривиальное название.

Категории подсемейств и родов разработаны не для всех вирусов. Видовые названия вирусов обычно связывают с вызываемыми ими заболеваниями (например, вирус бешенства) либо по названию места, где они были впервые выделены (например, вирусы Коксаки, вирус Эбола). Если семейство включает большое количество видов, то видовые названия дают в соответствии с антигенной структурой и разделяют их на типы (например, аденовирус 32 типа или вирус герпеса 1 типа). Реже используют фамилии учёных, впервые их выделивших (например, вирус Эпштейна-Барр или вирус саркомы Рауса). Иногда используют устаревшие названия групп вирусов, отражающих их уникальные эпидемиологические характеристики (например, арбовирусы).

В основу их классификации положен тип нуклеиновой кислоты, образующей геном. Соответственно выделяют рибовирусы (РНК-вирусы) и дезоксирибовирусы (ДНК-вирусы).

При систематизировании вирусов выделяют следующие критерии: сходство нуклеиновых кислот, размеры, наличие или отсутствие суперкапсида, тип симметрии нуклеокапсида, характери-

ка нуклеиновых кислот (молекулярная масса, полярность [плюс или минус], количество нитей в молекуле либо наличие сегментов, наличие ферментов), чувствительность к химическим агентам (особенно к эфиру), антигенная структура и иммуногенность, тропизм к тканям и клеткам, способность образовывать тельца включений.

Дополнительный критерий – симптоматология поражений: способность вызывать генерализованные поражения либо инфекции с первичным поражением определённых органов (нейроинфекции, респираторные инфекции и др.).

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 1. Краткая история развития микробиологических знаний

Этап	Исторический период	Характеристика периода	Основные имена и события
1. Эвристический	С древних времен до второй половины XVII в.	Эмпирическое использование микробиологических процессов в хозяйственной деятельности и накопление предположений о связи заразных начал с рядом болезней.	Дж. Фракастори (1546 г.). Разработал идею о живых возбудителях (контангиях) и предложил систему профилактики.
2. Морфологический	Со второй половины XVII в. до второй половины XIX в.	Создание микроскопа, открытие и описание микроорганизмов.	А. Левенгук (1632–1723). Усовершенствовал микроскоп, обнаружил, описал и зарисовал основные формы бактерий.
3. Физиологический	Со второй половины XIX в. до нач. XX в.	Изучение не только строения, но и жизнедеятельности микроорганизмов и их роли в природе. Создание медицинской микробиологии, открытие и описание многих возбудителей инфекционных болезней. Создание почвенной и технической микробиологии, экологии микроорганизмов.	Л. Пастер (1845–1916). Изучил микробиологию брожения и гниения, открыл маслянокислое брожение и анаэробное дыхание, разработал метод пастеризации. Р. Кох (1843–1910). Разработал важнейшие методы микробиологических исследований и триаду доказательств роли возбудителя в этиологии инфекционной болезни.

Этап	Исторический период	Характеристика периода	Основные имена и события
4. Иммунологический	С нач. XX в. до второй половины XX в.	Создание теории иммунитета, разработка методов производства и применения вакцин.	Л. Пастер. Создал первые аттенуированные вакцины. И.И. Мечников (1845–1916). Разработал фагоцитарную (клеточную) теорию иммунитета. П.Эрлих. Разработал гуморальную теорию иммунитета.
5. Молекулярно-биологический	Со второй половины XX в. до настоящего времени	Изучены основы организации, реализации и регуляции наследственной информации.	Эвери, Мак-Леод, Мак-Картти (1944 г.) Доказали, что ДНК является носителем генетической информации.

Таблица 2. Виды световой микроскопии

Название	Сущность метода	Применение
Микроскопия с иммерсией	Применяется иммерсионный объектив, погруженный в масло, благодаря чему устраняется преломление световых лучей, идущих через объектив и достигается наилучшее освещение объекта.	Изучение живых и фиксированных окрашенных бактерий при максимальном для светового микроскопа увеличении объектива х 90, х100.
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, их подвижности, особенностей жизнедеятельности.
Темнопольная микроскопия	Используется конденсор или объектив с затемненным центром. Метод основан на явлении дифракции при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндала).	Изучение живых объектов величиной 0,02–0,06 мкм.

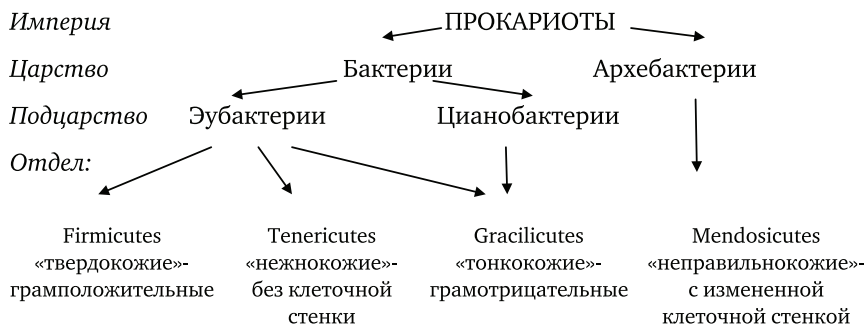


Схема 1. Систематика прокариот

Правила работы с иммерсионным объективом.

1. Установить максимальную освещенность поля зрения. Поместить препарат с каплей иммерсионного масла на предметный столик, установить иммерсионный объектив.
2. Глядя сбоку, макровинтом привести объектив до соприкосновения с каплей.
3. Глядя в окуляр, макровинтом осторожно установить нечеткое, а микровинтом – четкое изображение объекта. Провести микроскопию.
4. После микроскопии поднять тубус, препарат удалить, а объектив очистить от масла.

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Классификация микроорганизмов

1. Исследование аминокислотно-липидного состава прокариотической клетки используется в:
 - а) генотаксономии
 - б) хемотаксономии
 - в) серотаксономии
 - г) нумерической таксономии
2. G^- бактерии относятся к отделу:
 - а) Mendosicutes
 - б) Firmicutes
 - в) Tenericutes
 - г) Gracilicutes
3. В систематике вирусов окончание -virus имеет название:
 - а) семейства
 - б) подсемейства
 - в) рода
 - г) вида

4. К молекулярно-биологическим признакам в таксономии относятся:

- а) % ГЦ пар
- б) тинкториальные свойства
- в) тип окислительного обмена
- г) тип питания

5. К внутривидовой таксономической категории относится:

- а) чистая культура
- б) морфовар
- в) штамм
- г) клон

6. Микоплазмы, лишенные клеточной стенки, относятся к от-
делу:

- а) *Mendosicutes*
- б) *Gracilicutes*
- в) *Firmicutes*
- г) *Tenericutes*

7. К физиологическим признакам в таксономии прокариот от-
носятся:

- а) тинкториальные св-ва
- б) культуральные св-ва
- в) нуклеотидный состав ДНК
- г) антигенная структура

8. Триба объединяет сходные:

- а) семейства
- б) виды
- в) роды
- г) порядки

9. В систематике вирусов окончание –*viridae* имеет название:

- а) рода
- б) вида
- в) семейства
- г) подсемейства

10. Изучение антигенной структуры бактерий используется в:

- а) хемотаксономии
- б) серотаксономии
- в) генотаксономии
- г) нумерической таксономии

11. По антигенной структуре внутри вида выделяют:

- а) морфовары
- б) штаммы
- в) серовары
- г) клоны

12. К отряду *Gracilicutes* относятся:

- а) микоплазмы
- б) Гр⁻ бактерии
- в) Гр⁺ бактерии
- г) архебактерии

13. Первый признак, положенный в систематику вирусов:

- а) тип симметрии
- б) круг хозяев
- в) антигенная структура
- г) тип нуклеиновой кислоты

14. Информация о многочисленных равнозначных признаках
используется в:

- а) нумерической таксономии
- б) хемотаксономии
- в) генотаксономии
- г) серотаксономии

15. К морфологическим признакам в таксономии бактерий относится:

- | | |
|---|-------------------------|
| а) тип питания | в) тинкториальные св-ва |
| б) последовательность нуклеотидов в ДНК | г) тип метаболизма |

16. Окончание -virinae в систематике вирусов имеет название:

- | | |
|--------------|-----------------|
| а) вида | в) подсемейства |
| б) семейства | г) рода |

17. Чистая культура, выделенная из определенного источника, называется:

- | | |
|-----------|-------------|
| а) клон | в) штамм |
| б) биовар | г) морфовар |

18. К биохимическим признакам в таксономии бактерий относятся:

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| а) протеолитические св-ва | в) тинкториальные св-ва |
| б) антигенная структура | г) культуральные св-ва |

19. Метод молекулярных зондов используется в:

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| а) хемотаксономии | в) серотаксономии |
| б) генотаксономии | г) нумерической таксономии |

20. К отделу Mendosicutes относятся:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| а) Гр ⁻ бактерии | в) Гр ⁺ бактерии |
| б) археобактерии | г) микоплазмы |

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 1.

Микроскопический метод исследования. Микроскопия с иммерсией

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить устройство и принцип работы светового биологического микроскопа.
2. Освоить технику работы с иммерсией.

Описательная часть лабораторного занятия.

Микроскопический метод исследований является одним из самых главных в микробиологической практике. Он применяется для изучения формы, размеров, особенностей структуры микроорганизмов.

Существует два принципиально разных вида микроскопии: светоптическая и электронная.

В первом случае для освещения объекта используется поток световых лучей. Световые микроскопы предназначены для изучения объектов, величина которых не менее 0,2–0,3 мкм. Их общее увеличение составляет 2,0–2,5 тыс. раз, но полезное увеличение, при котором изображение объекта достаточно четко различимо – до 1,5 тыс. раз.

Любой световой биологический микроскоп имеет механическую и оптическую части. Механическая часть включает штатив, состоящий из основания и тубосодержателя, предметный столик с центральным отверстием, зажимами и центровочными винтами, тубуса, в верхнюю часть которого вставляются окуляры: 1 (монокулярный микроскоп) или 2 (бинокулярный микроскоп). В нижней части есть револьверное устройство с отверстиями для объективов и два винта для передвижения тубуса. Для грубой наводки служит макрометрический винт (кремальера), для тонкой – микрометрический винт, полный оборот которого смещает тубус на 0,1 мм.

Оптическая часть включает источник света, конденсор, окуляры и объективы. Конденсор собирает параллельные лучи, испускаемые источником света, в одной точке – фокусе, который должен находится в плоскости препарата. Пройдя через препарат, лежащий на предметном столике, свет попадает в объектив, дающий увеличенное и перевернутое изображение объекта. Увеличение объектива обозначается на его оправе. Иммерсионным (от лат. *immersio* – погружаю) объективом пользуются, погружая его в масло (кедровое, касторовое, укропное, вазелиновое, гвоздичное) или воду. Это делается для того, чтобы избежать рассеивания световых лучей при переходе их из предметного стекла в воздух из-за разницы в показателях преломления. Из объектива изображение поступает в окуляр. Окуляр увеличивает изображение, но не переворачивает его. Увеличение также указано на оправе.

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличений его объектива и окуляра. Объектив и окуляр подбирают таким образом, чтобы это произведение не выходило за рамки полезного увеличения. При этом лучше брать более мощный объектив и к нему подбирать окуляр.

В случае электронной микроскопии для просвечивания объекта вместо света используется быстрый поток электронов, а стеклянные

линзы заменены электромагнитными полями. Электронный микроскоп имеет разрешающую способность 0,1–0,3 нм и применяется для изучения субмикроскопического строения клеток и вирусов. Источником электронного потока служит катодная лампа с вольфрамовой нитью, которая разогревается до 2500 °С. При этом освобождаются электроны, которые летят в вакууме по направлению к аноду. Чем больше напряжение между катодом и анодом, тем выше разрешающая способность микроскопа. Вышедшие из электроннолучевой пушки электроны попадают в конденсорную электромагнитную «линзу», которая сводит их на объект, лежащий на тонкой (около 1 мкм) пленке коллодия. После этого расходящийся пучок электронов попадает в объектную «линзу», которая вновь собирает его и дает первое (промежуточное) увеличение объекта. Это изображение можно видеть на специальном промежуточном флуоресцирующем экране через специальное стеклянное оконце.

Через отверстие в центре промежуточного экрана поток электронов попадает в электромагнитное поле проекционной «линзы», которая дает увеличенное изображение. Оно проецируется на флуоресцирующий экран или на фотографическую пластинку. Можно прибегнуть также к последующему оптическому увеличению. Максимальное увеличение микроскопа 1 000 000 раз (сам микроскоп увеличивает в 100 000 – 200 000 раз, окончательное увеличение достигается при фотопечати). Способ при всех своих преимуществах, связанных с огромным увеличением изучаемых объектов, имеет свои недостатки. При его помощи нельзя наблюдать живые клетки, так как, проходя через препарат, электроны убивают ее.

Оснащение лабораторного занятия.

Готовые микропрепараты – мазки дрожжей рода *Sacharomyces*.

Световые микроскопы. Флаконы с иммерсионным маслом, флаконы с бензином, фланелевые тряпочки.

Таблицы с изображением микроскопов разных типов.

Ход выполняемой работы.

1. Изучить устройство светового биологического
2. Подготовить микроскоп к работе, расположить на предметный столик готовый мазок дрожжей и найти изображение объекта с помощью малого (X8 или 10) сухого объективов.

3. Опуская и поднимая конденсор, сужая и раскрывая диафрагму, пронаблюдать изменение силы освещения и контрастности препарата.

4. Изучить правила работы с иммерсией.

5. Микроскопировать препарат дрожжей с помощью иммерсионного объектива (X90 или 100).

6. Зарисовать изображения препарата при малом и иммерсионном увеличении в протокол занятия.

7. Научиться осуществлять уход за микроскопом, который включает следующие правила:

– после работы иммерсионное масло удалить сухой чистой, батистовой или фланелевой тряпочкой, затем протереть фронтальную линзу объектива тряпочкой, смоченной бензином, эфиром или ксилолом (таким же образом удаляется иммерсионное масло с конденсора и препарата с покровным стеклом);

– в промежутках между работой микроскоп должен находиться в нейтральном положении с отвернутыми от вертикальной оси объективами и максимально опущенным тубусом, закрытый деревянным футляром или полиэтиленовым чехлом.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 1. Краткая история развития микробиологических знаний.

2. Таблица 2. Виды световой микроскопии.

3. Схема 1. Систематика бактерий.

4. Правила работы с иммерсионным объективом

б) Выучить:

1. Устройство светового микроскопа.

2. Виды световой микроскопии – суть.

3. Правила работы с иммерсией.

4. Принципы систематики бактерий

5. Классификация бактерий.

6. Особенности классификации вирусов.

Рабочее задание:

1. Изучить устройство светового биологического микроскопа.
2. Составить таблицу «Устройство светового биологического микроскопа», записать в альбом
3. Изучить правила работы с иммерсией, записать в рабочую тетрадь.
4. Микроскопировать микробиологический препарат при малом и иммерсионном увеличении, сравнить изображения.
5. Зарисовать просмотренные изображения в альбом.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Мазок дрожжей, окраска простым методом, X10;
2. Рис. 2. Мазок дрожжей, окраска простым методом, X100;
3. Таблица «Устройство светового биологического микроскопа»

Пример заполнения альбома:

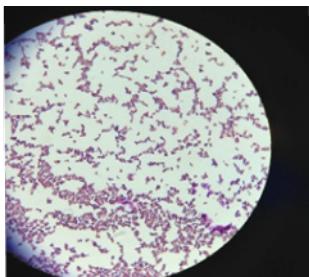


Рис. 1. Мазок дрожжей, окраска фуксином, X10

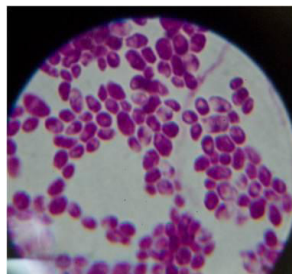


Рис 2. Мазок дрожжей, окраска фуксином, X100

Таблица. Устройство светового биологического микроскопа

Часть микроскопа	Деталь микроскопа	Назначение
Механическая		
Оптическая		

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учрежд. высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464с.
4. Овчарова Е.Н. Биология (растения, грибы, бактерии, вирусы) [Электронный ресурс]: учебное пособие для поступающих в вузы / Е.Н. Овчарова, В.В. Елина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 704с.
5. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
6. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.— Электрон. текстовые данные. — Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. — 123 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 2 «Приготовление препаратов. простое окрашивание»

1. Особенности морфологии бактерий.
2. Морфологические типы и формы бактерий.
3. Специфика химического состава прокариотической клетки.
4. Обязательные компоненты бактериальной клетки.
5. Необязательные компоненты бактериальной клетки.

ТЕМА 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Морфологические типы бактерий.

Большая часть бактерий имеет в среднем размеры 0,5–0,8 микрометров (**мкм**) х 3–5 мкм, но могут быть от 0,1 мкм до нескольких мм.

Разнообразие форм бактерий чрезвычайно велико.

Однако в общем выделяют следующие основные морфологические типы прокариот:

1. Шаровидные или кокки (с греч. – зерно).
2. Палочковидные.
3. Извитые.
4. Нитевидные.

Кокковидные бактерии (кокки) по характеру взаиморасположения после деления подразделяются на ряд вариантов.

1. **Микрококки.** Клетки расположены в одиночку. Входят в состав нормальной микрофлоры, находятся во внешней среде. Заболеваний у людей не вызывают.

2. **Диплококки.** Деление этих микроорганизмов происходит в одной плоскости, образуются пары клеток. Среди диплококков много патогенных микроорганизмов – гонококк, менингококк, пневмококк.

3. **Стрептококки** (от греч. streptos – цепочка). Деление осуществляется в одной плоскости, размножающиеся клетки сохраняют связь (не расходятся), образуя цепочки. Много патогенных микроорганизмов – возбудители ангины, скарлатины, гнойных воспалительных процессов.

4. **Тетракокки.** Деление в двух взаимоперпендикулярных плоскостях с образованием тетрад (т.е. по четыре клетки). Медицинского значения не имеют.

5. **Сарцины.** Деление в трех взаимоперпендикулярных плоскостях, образующее тьюки (пакеты) из 8, 16 и большего количества клеток. Часто обнаруживают в воздухе.

6. **Стафилококки** (от греч. staphyle – гроздь винограда). Делятся беспорядочно в различных плоскостях, образуя скопления, напоминающие грозди винограда. Вызывают многочисленные болезни, прежде всего гнойно-воспалительные.

Палочковидные формы бактерий

Большинство бактерий имеют цилиндрическую, или палочковидную, форму. Палочковидные бактерии различаются по форме, размеру в длину и в поперечнике, форме концов клетки, а также по взаимному расположению. Они могут иметь цилиндрическую

форму с прямыми концами или овальную – с закругленными или заостренными концами.

1. Бактерии – палочки, не образующие спор.

2. Бациллы – аэробные спорообразующие бактерии. Диаметр споры обычно не превышает диаметр клетки.

3. Клостридии – анаэробные спорообразующие микробы. Диаметр споры больше поперечника (диаметра) вегетативной клетки, в связи с чем клетка напоминает веретено или теннисную ракетку.

В зависимости от взаимного расположения отдельных клеток после деления палочковидные бактерии делят на собственно палочки (одиночное расположение клеток), диплобактерии или диплобациллы (парное расположение клеток), стрептобактерии или стрептобациллы (образуют цепочки различной длины).

Необходимо иметь в виду, что термин “бактерия” часто используют для обозначения всех микробов – прокариот. В более узком (морфологическом) значении бактерии – палочковидные формы прокариот, не имеющих спор.

Извитые формы бактерий

К этой группе относятся:

1. Вибрионы – (лат. *vibrio* – изгибаюсь), представляющие собой лишь 1/2 часть витка спирали, похожие на запятую.

2. Кампилобактерии могут быть в форме короткого завитка, располагаются обычно парой, напоминающей стилизованное изображение летящей птицы.

3. Спириллы – (от лат. *spira* – завиток), в форме длинных спирально изогнутых палочек, толстые, имеют от 2 до 6 некрутых завитка.

4. Спирохеты – тонкие, имеют различное число мелких крутых завитков спирали.

Нитевидные формы бактерий

Длинные многоклеточные формы, состоящие из недифференцированных клеток, покрытых общим чехлом (футляром), или сильно ветвящиеся клетки.

Клетки бактерий измеряют в микрометрах, а детали тонкой структуры – в нанометрах. Кокки обычно имеют диаметр около 0,5–1,5 мкм. Ширина палочковидных (цилиндрических) форм бактерий в большинстве случаев колеблется от 0,5 до 1 мкм, а

длина равняется нескольким микрометрам (2–10). Мелкие палочки имеют ширину 0,2–0,4 и длину 0,7–1,5 мкм. Среди бактерий могут встречаться и настоящие гиганты, длина которых достигает десятков и даже сотен микрометров. Формы и размеры бактерий значительно изменяются в зависимости от возраста культуры, состава среды и ее осмотических свойств, температуры и других факторов.

2. Строение прокариотической клетки. Обязательные компоненты.

Обязательными органоидами являются: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид.

Необязательными (второстепенными) структурными элементами являются: капсула, споры, ворсинки (пили и фимбрии), жгутики.

1. Клеточная стенка. Присуща абсолютному большинству бактерий (кроме, микоплазм). Толщина клеточной стенки 0,01–0,04 мкм. Она составляет от 10 до 50 % сухой массы бактерий. Количество материала, из которого построена клеточная стенка, изменяется в течение роста бактерий и обычно увеличивается с возрастом. Этот поверхностный слой, расположенный снаружи от цитоплазматической мембраны, выполняет защитную и опорную функции, а также придает клетке постоянную, характерную для нее форму (например, форму палочки или кокка) и представляет собой наружный скелет клетки. С ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий.

Основным структурным компонентом стенок, основой их жесткой структуры почти у всех исследованных до настоящего времени бактерий является *пептидогликан* – муреин (гликопептид, мукопептид). Это органическое соединение сложного строения, в состав которого входят сахара, несущие азот, – аминоксахара и 4–5 аминокислот. Причем аминокислоты клеточных стенок имеют необычную форму (D-стереоизомеры), которая в природе редко встречается.

Составные части клеточной стенки, ее компоненты, образуют сложную прочную структуру. От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий – отношение к окраске по Граму. В соответствии с ним выделяют две большие группы – грамположительные (грам+) и грамотрицательные (грам-) бактерии. Стенка грамположитель-

ных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с *генциановым фиолетовым* (окрашены в сине- фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет.

Химический состав и структура клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий различны.

Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий.

У них мощная, толстая, но несложно организованная клеточная стенка. В состав клеточных стенок у грамположительных бактерий входят: многослойный муреин, тейхоевые кислоты (сложные по составу и структуре соединения, состоящие из сахаров, спиртов, аминокислот и фосфорной кислоты) полисахариды, немного белков и липидов. Тейхоевые кислоты пронизывают каркас стенок муреина, скрепляя его слои. Т. о. в составе стенки преобладают многослойный пептидогликан и тейхоевые кислоты и нет липополисахаридов (ЛПС).

Особенности клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, но устроена более сложно, имея 3 различных слоя: 1–2-слойный муреин, слой липопротеинов, и слой наружной мембраны, по структуре аналогичной клеточным мембранам, и содержащей в верхней своей части ЛПС.

2. Цитоплазматическая мембрана ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет строение, согласно жидкостно-мозаической модели, и выполняет много важнейших функций (полифункциональна) – барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы – дыхательные, окислительно-восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки), синтетическую, а также спорообразование и деление клетки. Клетки имеют многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, которые называются мезосомы, они связаны с нуклеоидом и участвуют в делении клетки, спорообразовании и дыхании бактериальной клетки, увеличивая рабочую поверхность ЦПМ. У фотосинтезирующих форм также есть инвагинации ЦПМ, содержащие бактериохлорофиллы, которые называются хроматофоры.

3. Цитоплазма – сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения. Включе-

ния бывают с белковой оболочкой толщиной 2 нм и без белковой оболочки. К первым относятся: аэросомы, содержащие газовую смесь подобную воздуху; карбоксисомы, содержащие запас ферментов фиксации углекислого газа и хлоробиум-везикулы, содержащие запас пигментов, участвующих в фотосинтезе (хлоросомы с бактериохлорофиллами и фикобилисомы с фикобилинами). Вторые являются энергетическим резервом клетки. Бывают в форме гранул (гранулеза, гликоген, оксимасляная кислота, сера), в форме зерен (зерна волютина – полифосфаты) и в форме кристаллов (щавелевая кислота).

В цитоплазме располагаются также рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (внеядерное ДНК) и нуклеоид.

4. Нуклеоид находится в центральной зоне бактериальной клетки, называемой генофор. Это наследственный материал, представленный чаще всего одной «хромосомой» кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК, связанной с белками-гиразами и не связанной с белками-гистонами, как ДНК эукариот. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной и связан рецептором с определенным участком ЦПМ.

3. Строение прокариотической клетки. Необязательные компоненты.

К необязательным поверхностным структурам бактерий относятся *капсула, жгутики, микроворсинки*.

Капсула или слизистый слой окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют *микрокапсулу*, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, толщиной до 0,2 мкм, и *макрокапсулу*, обнаруживаемую при световой микроскопии, толщиной более 0,2 мкм. И те, и другие структурированы. Клеточная стенка многих бактерий сверху окружена слоем слизистого материала – неструктурированным чехлом, толщина которого может во много раз превосходить диаметр самой клетки.

Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов – фактором патогенности, препятствует фагоцитозу. У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов – чаще в организме хозяина. Капсулы чаще состоят из полисахаридов. Иногда они состоят из гликопротеидов (сложные

комплексы сахаров и белков) и полипептидов (род *Bacillus*), в редких случаях – из клетчатки (род *Acetobacter*).

Слизистые вещества, выделяемые в субстрат некоторыми бактериями, обуславливают, например, слизисто-тягучую консистенцию испорченного молока и пива.

Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (*флагеллиновых* по химическому составу) образований- жгутиков. Жгутики закреплены в клетке с помощью белковых колец базальной структуры.

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.

1. Монотрихи – имеют один полярный жгутик.
2. Лофотрихи – имеют полярно расположенный пучок жгутиков.
3. Амфитрихи – имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.
4. Перитрихи – имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у бактерий генетически детерминирована.

Ворсинки. К ним относятся:

1. Фимбрии или реснички – короткие нити, в большом количестве окружающую бактериальную клетку, с помощью которых бактерии прикрепляются к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек). Таким образом, фимбрии являются *факторами адгезии и колонизации*.

2. Пили (F-пили, фактор фертильности) – аппарат *конъюгации бактерий*, встречаются в небольшом количестве (1-2) в виде тонких белковых ворсинок из белка пилина.

Эндоспоры и спорообразование

Спорообразование – способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. *Эндоспоры* образуются в цитоплазме, отделяясь от нее с помощью ЦПМ. В зрелом состоянии они представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью.

Расположение и размер эндоспоры является диагностическим признаком.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 3. **Морфология бактерий**

Морфологический тип	Морфологическая группа	Описание
Кокковидные (сферические)	монококки	Одиночные клетки округлой, овальной, ланцетовидной или бобовидной формы
	диплококки	Пары округлых клеток
	тетракокки	Скопления из четырех округлых клеток
	стрептококки	Цепочки округлых клеток
	стафилококки	Скопления округлых клеток, расположенных в виде грозди винограда
	сарцины	Скопления в виде пачек из 8, 16, 32 и т. д. округлых клеток
Палочковидные	бактерии	Одиночные палочки, не образующие спор
	диплобактрии	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 превышающие диаметр клетки
	клостридии	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, часто расположены попарно
Нитевидные	постоянные нити	Многоклеточные формы из палочковидных клеток, соединенных в длинные цепи с помощью слизи, общих чехлов или цитоплазматических мостиков
	временные нити	Образуются палочковидными клетками при нарушении деления, могут ветвиться

Таблица 4. Особенности клеточных стенок бактерий

Тип клеточной стенки	Толщина и сложность	Основные структурные компоненты
Гр+	20–80 нм простая, из 1-й части	Многослойный муреин, пронизанный тейхоевыми кислотами, в верхней части стенки небольшое количество белков, полисахаридов, реже липидов.
Гр-	15–20 нм сложная, из 3-х частей	Нижняя часть: 1–2-слойный муреин; Средняя часть: слой липопотеина; Верхняя часть: наружная мембрана, подобная ЦПМ, с ЛПС и порами, образованными триплетами белков-поринов

Таблица 5. Включения и необязательные компоненты прокариотической клетки

Включения бактерий			
Тип включений	Название	Характеристика	
С белковой оболочкой толщиной 2 нм	аэросомы	Содержат газовую смесь подобную воздуху, обеспечивают плавучесть	
	карбоксисомы	Содержат запас ферментов фиксации углекислого газа	
	хлоробиум-везикулы: а) хлоросомы б) фикобилисомы	Содержат запас пигментов, участвующих в фотосинтезе: а) бактериохлорофиллов; б) фикобилинов	
Без белковой оболочки	Гранулеза	В форме гранул	Энергетический резерв клетки
	Гликоген		
	Оксимасляная кислота		
	Сера		
	Полифосфаты	В форме зерен (зерна волютина)	
	Щавелевая кислота	В форме кристаллов	
Необязательные структуры прокариотической клетки			
Капсулы			
Название	Толщина		Упорядоченность структуры
микрокапсулы	менее 0,2 мкм		структурированы
макрокапсулы	более 0,2 мкм		структурированы
слизистые чехлы	больше диаметра клетки		неструктурированы

<i>Количество и расположение жгутиков</i>		
Количество	Расположение	Название бактерий с таким расположением жгутиков
1	с одного полюса клетки	монотрихи
пучок	с одного полюса клетки	лофотрихи
2 или 2 пучка	с двух полюсов клетки	амфитрихи
много	по всей поверхности	перитрихи
<i>Виды ворсинок</i>		
Название	Количество	Функция
пили	1-2 на клетку	конъюгация бактерий, взаимодействие с фагами
фимбрии	много по всей поверхности	адгезия (прикрепление к субстрату)
<i>Расположение эндоспор</i>		
место расположения в клетке		название расположения
по середине клетки		центральное
на конце клетки		терминальное
возле конца клетки		субтерминальное

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ.

Морфология и структура прокариот.

1. Все утверждения о клеточной стенке Гр⁺ бактерий верны, кроме:

- а) толстая в) содержит тейхоевые кислоты
- б) сложная г) содержит многослойный муреин

2. Производными ЦПМ являются:

- а) мезосомы в) рибосомы
- б) нуклеоид г) генофор

3. Бактерии, имеющие один изгиб:

- а) спириллы в) клостридии
- б) бациллы г) вибрионы

4. Микрокапсулы:

- а) менее 0,2 мкм толщиной, структурированы
- б) менее 0,2 мкм толщиной, не структурированы
- в) более 0,2 мкм толщиной, структурированы
- г) более 0,2 мкм толщиной, не структурированы

5. Все утверждения о нуклеоиде верны, кроме:
а) содержит 1 кольцевую ДНК в) содержит белки гиразы
б) содержит белки гистоны г) область расположения – генофор
6. Спорообразующие формы:
а) бациллы в) стрептококки
б) бактерии г) спирохеты
7. К включениям с белковой оболочкой относятся:
а) хлоробиум – везикулы в) гранулы гликогена
б) зерна волютина г) скопления гранулезы
8. Все утверждения о клеточной стенке Гр-бактерий верны, кроме:
а) содержит ЛПС в) содержит одно-двухслойный муреин
б) сложно устроена г) содержит тейхоевые кислоты
9. Бактериохлорофиллы локализируются в:
а) мезосомах в) карбоксисомах
б) хроматофорах г) рибосомах
10. Жгутики располагаются пучком у одного конца бактериальной клетки:
а) у монотрихов в) у перитрихов
б) у амфитрихов г) у лофотрихов
11. Карбоксисомы содержат:
а) бактериохлорофилл в) ферменты фиксации CO_2
б) фикобилины г) смесь газов, подобную воздуху
12. Все утверждения относительно слизистых чехлов верны, кроме:
а) полисахаридной природы в) не структурированы
б) структурированы г) толщина более диаметра клетки
13. Большое количество крутых мелких завитков имеют:
а) спириллы в) спирохеты
б) кампилобактерии г) вибрионы
14. Все утверждения о том, что ЦПМ осуществляет следующие процессы верны, кроме:
а) синтез белка в) окислительное фосфорилирование
б) синтез муреина г) образование инвагинаций
15. У Гр-бактерий в клеточной стенке нет:
а) наружной мембраны в) тейхоевых кислот
б) липопотеида г) ДАП

следуют негустые суспензии микробных клеток, то каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Затем у края капли ставят на ребро покровное стекло, держа его под острым углом к предметному, и осторожно опускают на каплю. При этом капля «раздавливается» и заполняет пространство между двумя стеклами. Нативные препараты микроскопируют, слегка опуская конденсор.

К *фиксированным препаратам* относятся мазки. Приготовление фиксированного окрашенного препарата включает: 1) приготовление мазка; 2) высушивание мазка; 3) фиксацию; 4) окраску.

1). Препараты для окрашивания готовят на предметных стеклах. Из жидких культур каплю материала наносят на предметное стекло и размазывают бактериологической петлей. Из культуры на плотной среде петлей берут небольшую часть, размешивают в заранее нанесенной на предметное стекло капле водопроводной воды или физиологического раствора и размазывают по стеклу. Мазок должен быть тонким, размером 1–2 см², круглой или овальной формы. Материал в мазке должен быть размещен равномерно.

2). Высушивать препарат лучше всего на воздухе при комнатной температуре. Если же высушивание препарата замедленно, то его подогревают, держа стекло мазком вверх, в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки. Нельзя допускать перегревание препарата, так как при этом может произойти деформация клеток микробов.

3). Фиксация препарата необходима для прикрепления микробов к стеклу и для улучшения их восприимчивости к окраске. Фиксация жаром – держа стекло мазком вверх, его трижды проводят через пламя горелки.

4). Окрашивают клетки в основном анилиновыми красителями. Для выявления только формы бактерий используют *простой (ориентировочный) метод окраски*. Этот метод заключается в окрашивании микробов каким-либо одним красителем. При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель, закрепленный над кристаллизатором. На стекло наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он полностью покрывал мазок. Выдерживают необходимое время и смывают краситель струей воды до тех пор, пока с мазка не перестанут стекать цветные струйки.

При микроскопии с иммерсией каплю масла наносят прямо сверху на препарат, с которого масло после работы можно удалить сухой мягкой тряпкой.

Оснащение лабораторного занятия.

Флаконы с водными суспензиями смеси непатогенных микроорганизмов разных морфологических типов. Кристаллизаторы, препаратодержатели, покровные и предметные стекла, спиртовки, спички, бактериологические петли, капельницы с фуksiном Пфeyфeyера и метиленовым синим Леффлера, флаконы с водой, фильтровальная бумага, стеклографы.

Световые микроскопы. Флаконы с иммерсионным маслом, флаконы с бензином, фланелевые тряпочки.

Таблицы с изображением бактерий разных морфологических типов.

Ход выполняемой работы.

1. Приготовить из суспензии смеси микроорганизмов препараты «раздавленная капля» и мазок.

2. Окрасить часть мазков фуksiном Пфeyфeyера, а часть синим Леффлера для сравнения возможности разных красителей.

3. Промикроскопировать подготовленные препараты при разной степени увеличения (X10, X100), регулируя освещенность с помощью конденсора в зависимости от свойств препарата.

4. Зарисовать в альбоме увиденные изображения нативных и фиксированных окрашенных разными красителями препаратов при увеличении X100. Все рисунки подписать.

5. Просмотреть с иммерсией готовые препараты бактерий разных морфологических типов. Сравнить увиденные под микроскопом изображения с табличными.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 3. Морфология бактерий.
2. Таблица 4. Особенности клеточных стенок бактерий.
3. Таблица 5. Включения бактерий и необязательные компоненты прокариотической клетки

б) Выучить:

1. Особенности морфологии бактерий.

2. Морфологические типы и формы бактерий.
3. Специфика химического состава прокариотической клетки.
4. Обязательные компоненты бактериальной клетки.
5. Необязательные компоненты бактериальной клетки.

Рабочее задание:

1. Изучить методику приготовления мазка и простого окрашивания.
2. Приготовить мазок смеси микроорганизмов, окрасить простым методом.
3. Изучить методику приготовления препарата «раздавленная капля».
4. Приготовить препарат «раздавленная капля» смеси микроорганизмов.
5. Промикроскопировать готовые микробиологические препараты с иммерсией.
6. Зарисовать просмотренные изображения в альбом.

Содержание альбома:

1. Рис. 1 Мазок смеси бактерий и дрожжей, окраска простым методом, X100;
2. Рис. 2 Нативный препарат «раздавленная капля» смеси бактерий и дрожжей, X100;

Пример заполнения альбома:



Рис. 1. Мазок смеси микроорганизмов, окраска простым методом, X100

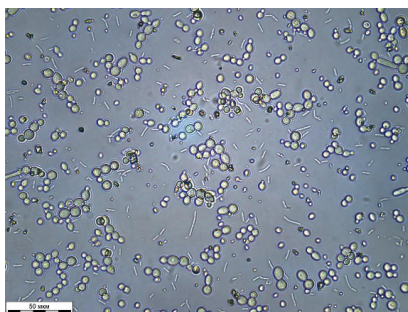


Рис. 2. Нативный препарат «раздавленная капля» смеси бактерий и дрожжей, X100

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464с.
4. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
5. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие / Тюменцева Е.Ю. – Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>
6. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова. – М., 2005. – 608 с.

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 3.

«Дифференциальное окрашивание. Окраска по Граму».

1. Особенности организации специфических грамотрицательных бактерий.
2. Особенности организации специфических грамположительных бактерий.
3. Особенности организации микоплазм, археобактерий, вирусов, фагов.

ТЕМА 3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Специфика морфологии групп грамотрицательных бактерий.

Кроме перечисленных, есть группы прокариот, обладающие специфическими морфологическими и другими биологическими

особенностями. Среди грамотрицательных бактерий встречаются следующие варианты.

Есть **бактерии, обладающие выростами**, количество которых определяет специфику формы клетки. У простекобактерий выросты клетки – простеки – содержат цитоплазму и окружены ЦПМ и клеточной стенкой. Их количество – от 2 до нескольких десятков. У стебельковых бактерий образуется один стебелек. Это внеклеточный вырост, состоящий из переплетенных фибрилл или капсального материала, поэтому клетка имеет грушевидную форму.

Слизеобразующие, скользящие по субстрату палочковидные бактерии образуют группу **миксобактерий**. При недостатке питания они образуют плодовые тела разного цвета и формы, состоящие из покоящихся округлых клеточных форм – микоспор, окруженных общей вязкой пленчатой оболочкой.

Спирохеты имеют постоянную спиральную форму из-за строения муреина (первичные завитки) и изгиба всего тела – протоплазматического цилиндра – за счет аксиальной нити из нескольких жгутикоподобных фибрилл. Они тянутся с концов клетки навстречу друг другу и перекрываются в центральной части. Проходят они под наружной мембраной и обвивают клеточное тело, образуя вторичные завитки.

Риккетсиями называются мелкие, плейоморфные бактерии, которые в течение жизненного цикла могут иметь кокковидную, палочковидную, нитевидную, кольцевидную формы. Многие являются облигатными внутриклеточными паразитами.

Другие мелкие коккобактерии, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами, называются **хламидии**. Они представлены двумя клеточными формами, способными существовать как внутри-, так и внеклеточно. Их специфический жизненный цикл включает в себя: 1) внеклеточная стадия – элементарные тельца, мелкие, сферической формы; 2) внутриклеточная стадия – ретикулярные тельца, более крупные, размножающиеся; 3) переходная стадия – промежуточные тельца, выходящие из зараженной клетки.

Следующая группа **цианобактерии**. Они бывают одноклеточные (разной формы), нитчатые, колониальные. Отличительной особенностью является наличие в клеточной стенке вместо липопротеина слоя пектиновых веществ, но по отношению к окраске по Граму они являются грамотрицательными. Центральная часть

клетки – центроплазма – бесцветная, содержит нуклеоид; периферическая часть – хроматоплазма – окрашенная, содержит хроматофоры, содержащие хлорофилл А.

2. Специфика морфологии групп грамположительных бактерий.

В отдел грамположительных бактерий входят **коринеформные бактерии**. Они плеоморфны, в ходе жизненного цикла изменяются в последовательности кокк-палочка-кокк. На концах палочек часто бывают булабовидные утолщения, также палочки могут ветвиться. В мазке видны как скопления в форме: Т, Х, V, III.

Актиномицеты (лучистые грибы) – это мицелиальные бактерии, клетки которых могут сильно ветвиться, на плотной питательной среде образуют субстратный и воздушный мицелий. По Граму красятся положительно. Среди них есть бактерии, размножающиеся спорами.

3. Специфика морфологии микоплазм и архебактерий.

Самые мелкие бактерии – **микоплазмы**. Они также плеоморфны, могут быть мелкими кокковидными, крупными шаровидными, в виде цепочки бус, разветвленными, спиральными. Характерные отличия: в составе ЦПМ есть стерины; не имеют клеточной стенки.

Архебактерии по составу т-РНК и р-РНК отличаются от прокариот и от эукариот; сходны с эукариотами по некоторым компонентам системы синтеза белка, но в целом это клетки прокариотического типа. Они бывают разной формы. Клеточная стенка не содержит настоящего муреина: есть ГР⁺ формы с псевдомуреином и ГР формы с поверхностным слоем из гликопротеина.

4. Морфология вирусов и фагов.

Вирусы выделяют в отдельное царство – царство Вира. Живыми их можно назвать условно, когда они заражают другой организм, а вне клетки они напоминают кристаллы. Внешний вид и размер вирусов зависят от их специализации. В общем случае они состоят из белковой оболочки – капсида, в которую «запечатана» ДНК или РНК. Иногда – белковое ядро обволакивает липидная мембрана, с включенными белками и углеводами, напоминающая ЦПМ. Белки кап-

сида расположены симметрично, образуя правильную геометрическую структуру (геометрический тип симметрии), чаще икосаэдры (20-гранник), спирали (спиральный тип симметрии) или вирионы с икосаэдрической головкой и спиральным хвостовым отростком (смешанный тип). Форма вирусов разнообразна и зависит от свойств белка, из которого построен вирус. Чаще всего вирионы представляют собой жгуты (палочки), шаровидные структуры или нитевидные.

Основные морфологические типы фагов также палочковидные, нитевидные или шаровидные. Шаровидные фаги, в свою очередь, могут быть: без отростка; с аналогами отростков; с коротким отростком; с длинным отростком и несокращающимся чехлом; с длинным отростком, у которого чехол сокращается, благодаря актиноподобному белку. Шаровидные с отростком фаги по форме скорее напоминают булаву и имеют смешанный тип симметрии белков капсида.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 1. Особенности организации некоторых групп бактерий

Отдел	Название группы	Характеристика
Gracilicutes	Обладающие выростами бактерий: а) протейкобактерии б) стебельковые бактерии	а) простеки – выросты клетки, содержащие цитоплазму и окруженные ЦПМ и клеточной стенкой, в количестве от 2 до нескольких десятков; б) стебельки – внеклеточные выросты, состоящие из переплетенных фибрилл или капсульного материала, в количестве 1.
	Миксобактерии (слизистые)	Слизеобразующие, скользящие по субстрату палочковидные бактерии, образующие при недостатке питания плодовые тела разного цвета и формы, состоящие из покоящихся округлых клеточных форм – микроспор, окруженных общей вязкой пленчатой оболочкой.
	Спирохеты	Имеют постоянную спиральную форму из-за строения муреина (первичные завитки) и изгиба всего тела за счет аксиальной нити из нескольких жгутикоподобных фибрилл, тянущихся с концов клетки навстречу друг другу и перекрывающихся в центральной части, которые проходят под наружной мембраной и обвивают клеточное тело (вторичные завитки).
	Риккетсии	Мелкие, плеоморфные (кокковидные, палочковидные, нитевидные, кольцевидные), многие – облигатные внутриклеточные паразиты

Отдел	Название группы	Характеристика
Gracilicutes	Хламидии	Мелкие коккобактерии, облигатные внутриклеточные паразиты, имеют жизненный цикл: 1) внеклеточная стадия – элементарные тельца, мелкие, сферической формы; 2) внутриклеточная стадия – ретикулярные тельца, более крупные, размножающиеся; 3) переходная стадия – промежуточные тельца, выходящие из зараженной клетки.
	Цианобактерии	Одноклеточные (разной формы), нитчатые, колониальные; в клеточной стенке вместо липопротеина слой пектиновых веществ; центральная часть клетки – центроплазма, бесцветная, содержит нуклеоид; периферическая часть – хроматоплазма, окрашенная, содержит хроматофоры.
Firmicutes	Коринеформные бактерии	Плеоморфны, цикл изменений: кокк-палочка-кокк; на концах палочек часто булабовидные утолщения, образуют скопления в форме: T, X, V, III, могут ветвиться.
	Актиномицеты (лучистые грибы)	Мицелиальные бактерии, клетки которых могут сильно ветвиться, на плотной питательной среде образуют субстратный и воздушный мицелий.
Tenericutes	Микоплазмы	Самые мелкие бактерии, плеоморфны, могут быть мелкими кокковидными, крупными шаровидными, в виде цепочки бус, разветвленными, спиральными; в составе ЦПМ есть стерин; не имеют клеточной стенки, ЦПМ покрыта капсулоподобным слоем.
Mendosicutes	Архебактерии	По составу т-РНК и р-РНК отличаются от прокариот, и от эукариот; сходны с эукариотами по некоторым компонентам системы синтеза белка, но в целом клетки прокариотического типа; разной формы; клеточная стенка не содержит муреина; есть ГР+ формы с псевдомуреином и ГР- формы с поверхностным слоем из гликопротеина.

Техника окраски по Грамму – Синеву.

1. На фиксированный мазок наложить бумажку Синева (фильтровальная бумага, пропитанная раствором генцианвиолета и высушенная) налить 2–3 капли воды, окрашивать 2 мин.

2. Петлей удалить бумажку Синева в лоток, слить избыток краски и нанести 2-3 капли раствора Люголя на 1 мин.

3. Слить избыток краски, нанести этиловый спирт – ректификат на 30 сек., для обесцвечивания Гр⁺ бактерий, промыть водой.

4. Дополнительно окрасить препарат фуксином Пфейфера 2 мин., промыть водой, высушить.

Микроскопическая картина: Gr^+ бактерии – фиолетового цвета, Gr^- – малинового.

Измерение бактерий.

1. Для измерения используется объективный микрометр (металлическая пластинка размером с предметной 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).

2. Вставить окуляр-микрометр между линзами окуляра делениями вниз, вывинтив его глазную линзу.

3. Поместить на предметный столик объект-микрометр и отцентрировать линейку при малом увеличении.

4. Установить объектив, при котором будут просматриваться микробы.

5. Совместить деления шкал обоих микрометров, рассчитать цену деления окуляр-микрометра при данной степени увеличения.

6. Поместить на предметный столик препарат вместо объект-микрометра.

7. Произвести измерение микробов, используя линейку окуляр-микрометра с рассчитанной ценой деления.

Окраска капсул по методу Бурри–Гинса.

1. Нанести на предметное стекло каплю черной туши и внести в нее культуру бактерий, размешать.

2. Сделать мазок ребром покровного стекла, высушить.

3. Зафиксировать мазок.

4. Нанести на мазок р-р карболового фуксина, разбавленный водой в соотношении 1 : 3 на 2–3 мин.

5. Промыть водой. Высушить.

Микроскопическая картина: на темно-сером фоне розовые клетки, окруженные бесцветной капсулой.

Окраска спор по методу Пешкова.

1. На фиксированный мазок нанести метиленовый синий Леффлера.

2. Нагревать стекло до закипания краски.

3. Кипятить в течение 15-20 сек.
 4. После остывания стекла промыть мазок водой.
 5. Докрасить мазок 0,5 % водным раствором нейтрального красного в течение 30 сек.
 6. Промыть водой, высушить.
- Микроскопическая картина: споры голубые, клетки розовые.

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Специфические группы микроорганизмов

1. Самые мелкие по размерам бактерии:

а) риккетсии	в) хламидии
б) микоплазмы	г) миксобактерии
2. Имеют выросты цитоплазмы, на которых могут образовываться почки:

а) слизистые бактерии	в) простекобактерии
б) стебельковые бактерии	г) цианобактерии
3. К G^- бактериям относятся:

а) актиномицеты	в) миксобактерии
б) спирохеты	г) простекобактерии
4. По структуре напоминает клеточную мембрану:

а) капсид	в) суперкапсид
б) вирион	г) гликопротеиновый шип
5. Не имеют в клеточной стенке муреина:

а) цианобактерии	в) простекобактерии
б) архебактерии	г) микоплазмы
6. X-образные формы при размножении могут образовывать:

а) коринеформные бактерии	в) микоплазмы
б) спирохеты	г) хламидии
7. Имеют строение клеточной стенки G^- типа:

а) актиномицеты	в) цианобактерии
б) микоплазмы	г) коринеформные бактерии
8. Не имеют клеточной стенки:

а) цианобактерии	в) микобактерии
б) микоплазмы	г) спирохеты
9. Плодовые тела образуют:

а) стебельковые бактерии	в) простекобактерии
б) архебактерии	г) слизистые бактерии

10. Обеспечивает сокращение хвостового отростка фага:
 - а) лизоцим
 - б) ДНК или РНК
 - в) актиноподобный белок
 - г) матриксный белок
11. Ретикулярные тельца – это стадия развития:
 - а) микоплазм
 - б) спирохет
 - в) риккетсий
 - г) хламидий
12. Отличительная особенность микоплазм:
 - а) клеточная стенка Гр⁻ типа
 - б) клеточная стенка Гр⁺ типа
 - в) отсутствие стеролов в ЦПМ
 - г) наличие стеролов в ЦПМ
13. Имеют признаки, сближающие их с эукариотами:
 - а) архебактерии
 - б) цианобактерии
 - в) миксобактерии
 - г) актиномицеты
14. Спорообразование как способ размножения свойственен:
 - а) спирохетам
 - б) актиномицетам
 - в) микоплазмам
 - г) простекобактериям
15. Капсомеры вирусов состоят из:
 - а) фосфолипидов
 - б) белковых субъединиц
 - в) вирионов
 - г) гликолипидов
16. Могут иметь булабовидные утолщения на концах клетки:
 - а) коринеформные бактерии
 - б) стебельковые бактерии
 - в) простекобактерии
 - г) цианобактерии
17. Фаги с сокращающимся чехлом имеют тип симметрии:
 - а) спиральный
 - б) икосаэдрический
 - в) октаэдрический
 - г) смешанный
18. Гр⁺ и Гр⁻ формы есть среди:
 - а) микоплазм
 - б) спирохет
 - в) архебактерий
 - г) слизистых бактерий
19. Цианобактерии отличаются от других Гр⁻ бактерий наличием в клеточной стенке:
 - а) муреина
 - б) пектиновых веществ
 - в) тейхоевых кислот
 - г) наружной мембраны
20. облигатными внутриклеточными паразитами являются:
 - а) спирохеты
 - б) риккетсии
 - в) микоплазмы
 - г) простекобактерии

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа №3.

Дифференциальное окрашивание. Окраска по Граму

Цель лабораторного занятия:

1. Познакомить студентов со сложными методами окрашивания препаратов.
2. Изучить окраску по Грамму как основной метод дифференциального окрашивания.
3. Изучить основные способы выявления спор, капсул.

Описательная часть лабораторного занятия.

Кроме простых ориентировочных методов окраски препаратов, позволяющих изучать морфологию прокариот, в микробиологической практике широко применяют сложные дифференциальные методы, выявляющие химические и структурные особенности прокариотических клеток. В этом случае могут применяться несколько красителей и других хим. реактивов. Успех окрашивания в первую очередь зависит от точности выполнения методики.

Самым универсальным из сложных методов окраски является метод окраски по Граму. Этот способ предложен датским ученым Кристиана Грамом в 1884 г. Характер окраски по Граму является важным таксономическим признаком, поэтому метод применяется преимущественно с диагностической целью при определении вида бактерий.

Метод основан на том, что в клеточных стенках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем трифенилметановой группы кристалвиолем (генцианвиолетом, метилвиолетом). Окрашенные микробы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. У других это соединение является нестойким, и после обработки спиртом растворяется. В результате этого бактерии обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая ярко розовый цвет. Первые микроорганизмы называются грамположительными, вторые – грамотрицательными.

Способность или неспособность клеток удерживать данный комплекс связывают с различным составом и структурой клеточ-

ной стенки. Существует несколько модификаций окраски по Граму: Калины Г. П., Эткинса, Николля и др. В практике нашла широкое применение модификация Синева, более удобная в работе. Окрашенные препараты изучают под микроскопом с использованием иммерсионной системы.

Для выявления химических и структурных особенностей бактерий применяются многочисленные дифференциальные методы окраски.

Выявление спор.

Для многих бактерий характерно образование по середине клетки или на одном из ее концов эндогенной споры круглой или овальной формы. Спора является защитным приспособлением для сохранения вида в измененных условиях среды, она чрезвычайно стойкая и требует специальных способов окраски.

Существует несколько способов окраски спор: способ Ожешки, способ Биттера, способ Шеффера и Фултона, способ Пешкова, способ Циля-Нильсена в модификации Мюллера.

Также можно использовать простые способы окраски или окраску по Граму. При этом споры остаются бесцветными (негативная окраска): они имеют вид светлых круглых включений, лежащих среди окрашенной бактериальной протоплазмы.

Выявление капсул.

Некоторые бактерии, особенно при росте на средах, богатых углеводами и солями кальция образуют капсулы, выявление которых также используется при идентификации.

Для выявления капсул можно применять простые негативные методы окраски, при которых капсулы не окрашиваются, и при микроскопировании обнаруживаются в виде светлых ореолов, окружающих окрашенные тела бактерий. Однако есть и специальные методы окраски, дающие более четкие препараты, например, способ Бурри, где как фон используют приготовленную особым образом тушь. Также есть более точный метод окраски тушью в модификации Гинса.

Оснащение лабораторного занятия.

Флаконы со смесью непатогенных бактерий и дрожжей.

Кристаллизаторы, препаратодержатели, предметные стекла, спиртовки, спички, бактериологические петли, бумажки Синева,

капельницы с раствором Люголя, фуксином Пфейфера, 96 %этанолом, флаконы с водой, фильтровальная бумага, стеклографы.

Микроскопы, флаконы с иммерсионным маслом, бензином; тряпочки для протирания оптики.

Таблицы с изображением грамположительных, грамотрицательных, кислотоустойчивых бактерий и схемой строения клеточной стенки бактерий.

Ход выполняемой работы.

1. Приготовить из смеси бактерий и дрожжей мазок, высушить, зафиксировать.

2. Разобрать по этапам методику окраски по Граму, обращая внимание на цвет микробов и его причины на каждом этапе.

3. Окрасить мазок по Граму в модификации Синева.

4. Подготовить микроскопы к работе и промикроскопировать приготовленные препараты с иммерсионной системой.

5. Зарисовать в альбоме увиденное изображение препарата, в котором должны находиться грамположительные (фиолетовые) и грамотрицательные (ярко-розовые), палочковидные бактерии, а также значительно более крупные дрожжи, окрашенные (обязательно) в фиолетовый цвет. Рисунок подписать.

6. Разобрать по таблице особенности строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

7. Ознакомиться с методами выявления спор и капсул.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица. Особенности организации некоторых групп бактерий.

2. Окраска по Граму, сущность и техника выполнения.

3. Выявление спор (по Пешкову) и капсул (по Бурри-Гинсу).

4. Измерение бактерий.

б) Выучить:

1. Особенности организации специфических грамотрицательных бактерий.

2. Особенности организации специфических грамположительных бактерий.

3. Особенности организации микоплазм.

4. Особенности организации архебактерий.
5. Особенности организации вирусов.
6. Особенности организации фагов.

Рабочее задание:

1. Изучить методику приготовления окраски по Граму в модификации Синева.
2. Приготовить мазок смеси бактерий и дрожжей, окрасить по Граму-Синеву, промикроскопировать с иммерсией.
3. Зарисовать просмотренное изображение в альбом.
4. Зарисовать этапы окраски по Граму.
5. Зарисовать примеры окраски по Пешкову и Бурри-Гинсу.

Содержание альбома:

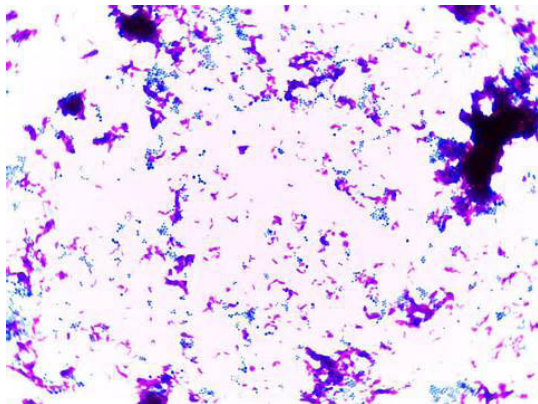


Рис. 1. Мазок смеси микроорганизмов, окраска по Граму-Синеву, X100

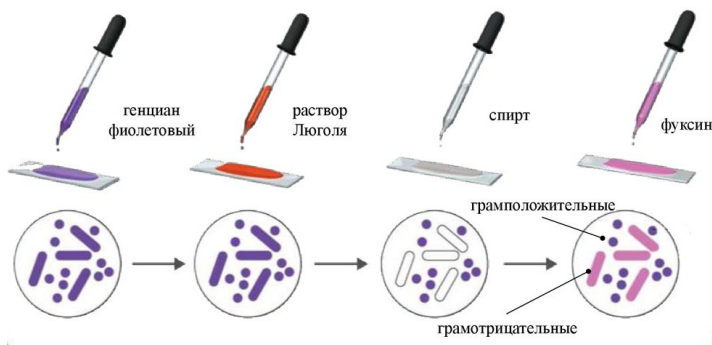


Рис. 2. Этапы окраски по Граму

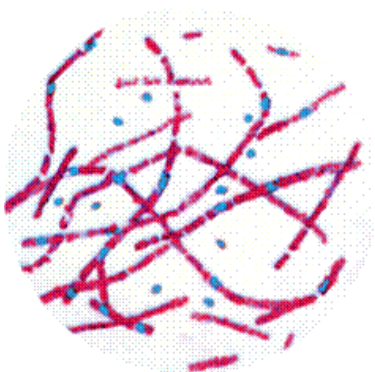


Рис. 3. Мазок спорообразующих бактерий, окраска по Пешкову, X100

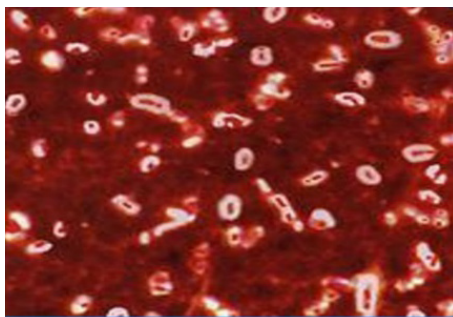


Рис. 4. Мазок капсульных бактерий, окраска по Бурри-Гинсу, X100

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках (учебное пособие). – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464с.
4. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М, 2004. – 256 с.
5. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие / Тюменцева Е.Ю. – Электрон. тексто-

вые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с. – Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>

6. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова. – М., 2005. – 608 с.

7. Шапиро Я. С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы [Текст]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро, 2003. – 323 с.

8. ibooks.ru[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://ibooks.ru>

9. Znanium.com[Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://znanium.com>

ОБРАЗЕЦ АЛЬБОМА ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Лабораторные работы

по микробиологии

студента 302 группы

ЕГФ, спец. «Биология»

Шешницана С.С.

2009—2010 уч. год

Лабораторная работа №1

11.09.2009

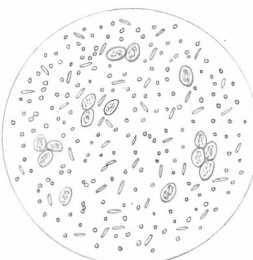
Микроскопический метод исследования

Рабочее задание:

1. Изучить устройство светового микроскопа.
2. Настроить микроскопирование с микроскопом.
3. Настроить окулярную сетку для микроскопа.

Правила работы с микроскопом:

1. Микроскоп с парфитом вверх до упора конденсорной установки к объективу света, поворачиваясь, направит луч света в сторону конденсора, так чтобы в объектив микроскопа попал свет от источника света.
2. В объектив микроскопа при малом увеличении установить микроскопическую установку после зрения. После этого препарат с объектом микроскопирования установить на предметной пластине, поворачивая установку микроскопа, чтобы объект попал в объектив.
3. После этого микроскопом с объективом до объектива установить с объективом.
4. В объектив микроскопа установить объектив, а микроскопическую установку установить в объектив. Проверить микроскопирование.
5. После микроскопирования микроскопом с объективом до объектива установить с объективом.



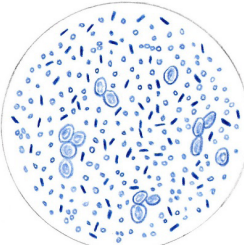
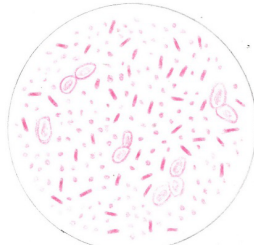
Смесь бактерий и грибов.
Препарат, раздробленная
капель.
(x 100)

Handwritten signature

Внешние формы микроорганизмов: простое окрашивание

Рабочее задание:

1. Приготовить из сушеных грибов и смеси бактерий мазок.
2. Окрашить этот мазок по методу Гримальди, а затем сделать срез для сравнения воздушности раствора красителя.
3. Приготовить микропрепарат.
4. Проконтролировать подготовку препарата при помощи увеличения.
5. Сравнить с микропрепаратом, полученным из сушеных грибов.

Мазок смеси бактерий и грибов
Окрашен метиленовым синим
(x 100)Мазок смеси бактерий и грибов
Окрашен фуксином
(x 100)

Техника приготовления мазка. Простая окраска

1. Предметное стекло слегка порозоват, затем ватным тампоном снять лишнее, нанести индивидуальную каплю из культуры бактерий и тонким слоем разровнять по поверхности стекла.
2. После высыхания проводить фиксацию грибов: проварить около 10 минут, либо использовать фиксаторы 3-5 мин.
3. После окраски грибов, оставить его на 1-2 мин, затем промывают водой, удалив лишнюю краску.
4. Предметное стекло промывают на водной или спиртовой ванне, лишнюю воду вытирают. После этого препарат равновешивают в спиртовой или масляной ванне.

Лабораторная работа №3

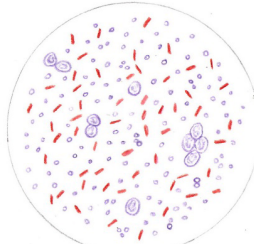
Дифференциальное окрашивание. Окрашка по Граму

Рабочее задание:

1. Приготовить из смеси бактерий мазок, высушить, зафиксировать.
2. Окрашить мазок по Граму в микроскопический вид.
3. Приготовить микропрепарат и установить оптимальное увеличение после увеличения.
4. Проконтролировать подготовку препарата с помощью увеличения.
5. Сравнить с микропрепаратом, полученным из сушеных грибов.

Техника окрашивания по Граму:

1. На фиксированный мазок нанести брызжиком Синой фиксатор (или 1-2 капли 95% спирта), оставить на 1-2 мин, затем промывают водой.
2. Затем удаляют брызжиком Синой, вытирают и добавляют на тонкий слой.
3. Снова добавляют спирт-реактив на 30 сек, промывают водой.
4. Дополнительно окрашивают препарат фуксином (или 1-2 капли 95% спирта), затем промывают водой и высушивают.

Мазок смеси бактерий и грибов
Окрашка по Граму (x 100)

Этапы окрашки по Граму



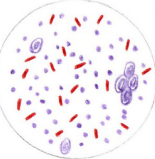
I. Фиксация



II. Промывка



III. Спирт



IV. Фуксин

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Раздел 1. СИСТЕМАТИКА И МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	4
Тема 1. ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ.	
КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	4
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	4
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ.....	12
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	14
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	19
Тема 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТ	19
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	19
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ.....	28
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	30
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	34
Тема 3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	34
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	34
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ.....	40
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	42
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	46
<i>Приложение. ОБРАЗЕЦ АЛЬБОМА ПО МИКРОБИОЛОГИИ</i>	<i>48</i>