

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра фундаментальной и прикладной биологии

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические рекомендации

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2026*

УДК 579.23(075.8)
ББК 28.450я73
С87

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 3 от 22.12.2025.

Составитель: старший преподаватель кафедры фундаментальной и прикладной биологии ВГУ имени П.М. Машерова **С.Э. Латышев**

Р е ц е н з е н т :

доцент кафедры экологии и географии ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук, доцент *А.А. Лакотко*

С87 **Структурная организация клеток микроорганизмов : методические рекомендации / сост. С.Э. Латышев. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2026. – 40 с.**

В данных методических рекомендациях приведена краткая информация по строению клетки и особенностям различных структур микроорганизмов. Издание содержит рекомендации по проведению лабораторных работ, перечень вопросов для самоконтроля. Предназначается для студентов факультета химико-биологических и географических наук, обучающихся по специальности 6-05-0511-03 Микробиология.

УДК 579.23(075.8)
ББК 28.450я73

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
РАЗДЕЛ I. Поверхностные структуры бактериальной клетки	6
Методы микроскопии в микробиологии	6
Лабораторная работа № 1. Устройство микробиологической лаборатории. Правила техники безопасности. Общие правила приготовления препаратов фиксированных микроорганизмов	8
Лабораторная работа № 2. Простое окрашивание микроорганизмов	11
Лабораторная работа № 3. Окраска микроорганизмов по Граму	13
Лабораторная работа № 4. Окраска кислотоустойчивых бактерий	14
Лабораторная работа № 5. Окраска капсулы бактерий. Выявление цитоплазматических включений	15
Лабораторная работа № 6. Приготовление прижизненных препаратов и определение подвижности микроорганизмов	16
РАЗДЕЛ II. Организация цитоплазматических структур. Нуклеоид. Эндоспоры	18
Лабораторная работа № 7. Окраска эндоспор бактерий	18
Лабораторная работа № 8. Окраска нуклеоида	19
Лабораторная работа № 9. Окраска цитоплазматических включений	20
РАЗДЕЛ III. Рост и деление бактерий	23
Классификация питательных сред	23
Способы стерилизации	24
Типы культур микроорганизмов. Способы выделения чистой культуры	25
Лабораторная работа № 10. Посев и пересев микроорганизмов. Описание колоний микроорганизмов	28
Лабораторная работа № 11. Учет численности микроорганизмов	32
Примерные темы докладов-презентаций в рамках КУСР	37
Список литературы	38

ВВЕДЕНИЕ

Структурная организация клеток микроорганизмов является одной из важнейших фундаментальных дисциплин в процессе подготовки микробиологов. Эта дисциплина формирует у студентов основные понятия о структурной организации микробных клеток, что в дальнейшем будет служить основой для понимания биохимических и физиологических особенностей микроорганизмов и позволит получить практические навыки работы с микроорганизмами, умение выделять чистые культуры микробов и поддерживать их рост.

Учебная дисциплина нацелена сформировать целостное представление у студентов о структурной организации и ведущих механизмах функционирования важнейших клеточных компонентов основных типов бактерий.

В задачи учебной дисциплины входит:

- Дать студентам информацию о поверхностных и внешних структурах бактериальной клетки, мембранных структурах клеток, органеллах движения бактерий, ядерном аппарате бактериальной клетки, строении цитоплазмы и цитоплазматических структур, покоящихся формах бактерий.
- Сформировать представления о молекулярных механизмах функционирования некоторых жизненных процессов бактерий.

В результате освоения учебной дисциплины студент должен

знать:

- общую схему организации прокариотических организмов;
- общее строение муреинового каркаса, строение различных групп муреина; особенности строения клеточных оболочек грамположительных, грамотрицательных бактерий и архей; строение и функционирование надоболочечных структур бактериальной клетки;
- строение и основные функции цитоплазматической мембраны и ее производных; организацию бактериального нуклеоида; виды и функции различных бактериальных включений;
- строение и функционирование жгутикового аппарата бактерий, виды движения бактерий;
- механизмы протекания клеточных циклов у бактерий, строение и образование покоящихся форм бактерий;
- способы генетического обмена у бактерий, механизмы регуляции биохимической активности бактериальной клетки; механизмы функционирования сигнальных систем бактерий;

уметь:

- выделять чистые культуры микроорганизмов;
- проводить количественный учет микроорганизмов;
- изготавливать препараты различных структур бактериальных клеток и проводить их микроскопическое исследование;

- применять полученные знания в практической деятельности в области бактериологических исследований;

иметь навыки:

- применения микробиологической терминологии;
- использования микроскопической техники и специального оборудования для изучения микробиологических объектов
- работы в современной микробиологической лаборатории.

Данные методические рекомендации предназначены для студентов факультета химико-биологических и географических наук, обучающихся по специальности 6-05-0511-03 Микробиология. Также рекомендации могут быть полезны для углубленного изучения биологии, подготовки к олимпиадам и учащимся других специальностей, сталкивающимся по роду своей деятельности с микроорганизмами.

РАЗДЕЛ I

ПОВЕРХНОСТНЫЕ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Микроорганизмы – это организмы не видимые не вооруженным глазом и имеющие размеры до 0.1 мм. Размер подавляющего большинства варьирует в пределах 0.5 – 3 мкм (самые мелкие имеют длину около 0.15 мкм, самые крупные достигают 750 мкм).

Общий план строения клетки микроорганизмов выглядит следующим образом: клетка состоит из протопласта и поверхностных структур. Протопласт включает цитоплазматическую мембрану вместе с цитоплазмой. Поверхностные структуры клетки, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны – клеточная стенка, капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки. Среди прокариот у бактерий клеточная стенка, состоящая из мууреина, является обязательным компонентом поверхностного аппарата (за исключением микоплазм).

Для изучения морфологии и особенностей клеточного строения представителей микроорганизмов применяются различные методы микроскопии.

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ В МИКРОБИОЛОГИИ

Изучение морфологии, особенностей строения, количественная оценка микроорганизмов, величина которых измеряется микрометрами, возможно при использовании микроскопов, обеспечивающих увеличение в сотни и тысячи раз. Изображение в световом микроскопе формируется за счет того, что изучаемые объекты с разной интенсивностью поглощают свет, или в связи с изменением фазы световой волны при прохождении через изучаемый объект.

Световая микроскопия, наиболее распространенная в настоящее время, включает в себя просвечивающую микроскопию (светлопольную и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную.

Светлопольная микроскопия

Позволяет определить форму клеток микроорганизмов, их размер, особенности окрашивания клеточных структур, способность к передвижению. Оптическая часть микроскопа состоит из объектива, окуляра и осветительного аппарата. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Однако разрешение микроскопа можно увеличить за счет использования иммерсионной системы, которая повышает коэффициент преломления. При работе с иммерсией изначально настраивают интенсивное и равномерное освещение, используя объектив малого

увеличения. Устанавливают препарат на предметном столике микроскопа и находят его на малом увеличении. Затем на предметное стекло с изучаемым объектом наносят каплю иммерсионного масла, с помощью револьверного устройства переводят иммерсионный объектив ($\times 90$, $\times 100$) в рабочее положение и макровинтом погружают объектив в масло. Используя микровинт, фокусируют изображение и настраивают четкость. В конце работы необходимо протереть иммерсионный объектив салфеткой, и перевести микроскоп на малое увеличение.

Темнопольная микроскопия

Основана на использовании специальных темнопольных конденсоров, имеющих затемненную среднюю часть. Исследуемые объекты в темном поле освещаются косыми лучами. Эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит черным, а клетки микроорганизмов в препарате интенсивно светятся, так как лучи отражаются от их поверхности, попадая в объектив. Разрешающая способность в темнопольной микроскопии выше, чем в светлопольной, однако данный метод не позволяет изучать внутреннее строение клеток и позволяет различать только их контуры.

Фазово-контрастная микроскопия

Данный способ дает такую же разрешающую способность, как и светлопольная микроскопия, однако позволяет рассматривать и изучать живые полупрозрачные и прозрачные объекты без окрашивания и фиксации и выявлять включения и некоторые структуры. Данный метод основан на том, что с его помощью различия в фазе световых лучей, проходящие через исследуемый объект, превращаются в амплитудные, в результате чего объекты становятся более контрастными. Для фазово-контрастной микроскопии необходимо использовать специальный микроскоп, или оборудовать обычный микроскоп фазово-контрастным устройством.

Люминесцентная микроскопия

Основана на способности некоторых структур (хлорофилл, алкалоиды) или красителей светиться под действием падающего на них света. Однако клетки большинства микроорганизмов люминесцируют слабо, для чего их обрабатывают специальными красителями – флуорохромами. Данный метод позволяет увеличить контрастность изображения, позволяет различить отдельные клеточные структуры, выявлять функциональное состояние клеток. Для люминесцентной микроскопии используют специальный микроскоп, либо обычный световой микроскоп с дополнительными светофильтрами.

Электронная микроскопия

Используется для обнаружения объекта использует пучок электронов, а не пучок света. Разрешающая способность электронного микроскопа для биологических исследований от 0,5 нм до 1 нм, что позволяет достигать увеличение препарата в 5000 – 50000 раз. Электронная микроскопия позволяет изучать

только неживые препараты, так как образец находится в условиях вакуума и интенсивного электронного облучения. Исследуемый материал наносят на тонкие пленки и располагают на пути потока электронов. Предварительно образец фиксируют химически: напыляют на пленки с микроорганизмами соли тяжелых металлов, либо заливают препарат в различные соли и контрастируют солями тяжелых металлов. Электронная микроскопия подразделяется на просвечивающую (трансмиссивную) и сканирующую (растровую). Первую используют для изучения внутреннего строения микроорганизмов; вторую – для получения трехмерного изображения микроорганизмов, выявления поверхностных структур, определения формы и архитектоники объекта.

Помимо вышеперечисленных методов все большее применение получают новые виды микроскопических исследований: рентгеновская, сканирующая зондовая, компьютерная интерференционная, лазерная конфокальная, позитронная эмиссионная томография.

Лабораторная работа № 1
Устройство микробиологической лаборатории.
Правила техники безопасности.
Общие правила приготовления препаратов
фиксированных микроорганизмов

Устройство микробиологической лаборатории

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Под лабораторные комнаты отводят светлые, просторные помещения. Поверхность столов и пол всех лабораторных помещений покрывают легко моющимся материалом, а стены окрашивают в светлые тона. Большое значение играет правильная организация рабочего места: оно должно быть оптимально освещено и иметь все необходимое для проведения исследований. Рабочий стол устанавливают таким образом, чтобы свет падал на него сбоку или прямо. На столе должно быть только необходимое оборудование: штатив с реактивами и красителями, спички, горелка, колба с водой, бактериологические петли.

Кроме основного рабочего помещения лаборатория должна иметь комнату с термостатом для выращивания микроорганизмов, стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, холодильную комнату, помещение для хранения культур микроорганизмов, моечную и т.д. Пересевы микроорганизмов осуществляют в боксах разных конструкций — от изолированных помещений до настольных камер (ламинаров), чистота атмосферы рабочего пространства в которых обеспечивается циркуляцией стерильного воздушного потока внутри камеры.

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. В ней не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно

проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Рабочие поверхности в помещении обеззараживают с помощью дезинфицирующих растворов. Также для этого можно использовать бактерицидные лампы в качестве источников ультрафиолетового излучения. Воздух в лаборатории очищают проветриванием.

Выполнение исследований в микробиологической лаборатории предполагает использование асептической техники. Асептика – совокупность методов и приёмов работы, направленных на создание безмикробных, стерильных условий для работы путём использования организационных мероприятий, активных обеззараживающих химических веществ, а также технических средств и физических факторов.

Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Заходить и работать в лаборатории разрешается только в халате.
2. Запрещается вносить в лабораторию посторонние вещи. Особенно верхнюю одежду.
3. Запрещается приносить и принимать в лаборатории пищу.
4. Материал, изучаемый в лаборатории, рассматривается как заразный. Во время работы необходимо использовать приемы, исключающие контакт с заразным материалом.
5. Работать на одном и том же месте.
6. На рабочем месте должно быть только необходимое оборудование.
7. Зажигать спиртовку спичками. Использовать для этого зажигалку или другую горящую спиртовку запрещено.
8. Аккуратно и благоразумно использовать электрооборудование. Без разрешения преподавателя использовать электроприборы и химические реактивы запрещено.
9. Не соприкасаться с металлическими и другими предметами с проводами и контактными частями электросети.
10. Соблюдать правила безопасного обращения с химическими реактивами.
11. Соблюдать чистоту и опрятность при работе.
12. По окончании занятий рабочее место и оборудование привести в порядок. Инструменты и рабочее место обрабатывают дезинфицирующим раствором.
13. Уходя из лаборатории обязательно вымыть руки.
14. При случайном попадании биологического материала на стол его необходимо протереть дезинфицирующим средством.
15. Результаты работы заносят в журнал, в котором указывают название опыта, его цель, дату постановки и окончания, условия проведения, объект исследования, полученные результаты и сделанные выводы.
16. К работе в лаборатории учащиеся могут быть допущены только после прохождения инструктажа по технике безопасности.

Приготовление препаратов микроорганизмов

Прежде, чем приступить к исследованию микроорганизмов, необходимо убедиться, что на рабочем месте находится только необходимое оборудование и реактивы. Рабочая поверхность стола должна быть покрыта материалом, который легко моется и дезинфицируется. На столе перед учащимся располагается спиртовка, кристаллизатор, сверху на котором находится препаратодержатель. Сбоку штатив с реактивами и красителями, штатив с бактериологической петлей и пробирками. Также для работы необходимы предметные и покровные стекла, культура исследуемых микроорганизмов.

Любой опыт с микроорганизмами начинают с отбора проб. На плотных и жидких питательных средах последовательность действий различается.

На плотной питательной среде микроорганизмы культивируют в пробирках и чашках Петри. В самом начале необходимо продезинфицировать бактериологическую петлю, которой будут отбирать микробиологический материал. Предварительно зажигают спиртовку. Петлю берут в правую руку, таким же образом, как ручку или карандаш, располагая ее между средним и указательным пальцами, придерживая сверху большим пальцем. Затем стерилизуют петлю прокаливанием (фламбированием): изначально вносят ушко и ожидают его покраснения в пламени, затем прокалывают стебелек и основание петли. Если плотная среда с микроорганизмами располагается в чашке Петри, левой рукой слегка ее приоткрывают, в образовавшееся пространство вносят простерилизованную петлю и прижимают петлю к верхней крышке чашки Петри 10 – 15 секунд. Это делается для того, чтобы предотвратить гибель микроорганизмов. После остужения, ушком петли прикасаются к микробиологическому материалу и слегка протягивают без нажима. Затем достают петлю из чашки Петри и выполняют необходимые манипуляции.

Если плотная питательная среда с микроорганизмами находится в пробирке, необходимо выполнить следующие действия. Пробирку берут в левую руку, мизинцем правой руки, в которой находится простерилизованная бактериологическая петля, достают пробку, обжигают горло пробирки в пламени спиртовки, ушко петли на несколько секунд прислоняют к стенке пробирки, а затем ушком прикасаются к исследуемому материалу и слегка протягивают без нажима. Достают петлю из пробирки, края пробирки и пробку обжигают в пламени и закрывают.

Из жидкой питательной среды пробы можно отбирать бактериологической петлей или пипеткой. Заранее простерилизованную пипетку берут за верхнюю часть и вводят в пробирку или колбу с питательной средой и исследуемыми объектами. Для отбора жидкой культуры вместе с пипеткой можно использовать резиновую грушу. При использовании автоматических пипеток используют сменные стерильные наконечники. Использованную

пипетку помещают в дезинфицирующий раствор, бактериологическую петлю стерилизуют прокаливанием.

После отбора, пробы микроорганизмов используют для приготовления препаратов, чтобы изучить морфологические и тинкториальные особенности, или для посева – чтобы размножить микроорганизмы, накопить биомассу, изучить культуральные свойства.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие организмы относятся к микроорганизмам?
2. Как правильно организовать рабочее место для приготовления микробиологических препаратов?
3. Какие помещения должны присутствовать в микробиологической лаборатории?
4. Что такое асептика?
5. Перечислите правила техники безопасности в микробиологической лаборатории.
6. Последовательность действий при отборе пробы из плотной и жидкой питательной среды.

Лабораторная работа № 2

Простое окрашивание микроорганизмов

Фиксированные окрашенные препараты микроорганизмов позволяют определять морфологию, изучать особенности строения, выявлять наличие специфических структур и включений. Последовательность приготовления препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксирование, окрашивание.

Для приготовления мазка первым действием прокалывают микробиологическую петлю и наносят ей каплю водопроводной воды из пробирки на предметное стекло. Далее снова прокалывают петлю и берут ей исследуемые организмы из питательной среды. Исследуемый материал вносят в каплю воды и размешивают. Полученную суспензию размазывают петлей на площади 1 – 2 см² максимально тонким слоем, чтобы мазок быстро высыхал. Правильно приготовленный мазок должен быть округлой или овальной формы, однородный по толщине, без гранул и вкраплений, полупрозрачный. Если микроорганизмы для изучения берут из жидкой питательной среды, каплю воды можно не наносить, а отбор пробы производить бактериологической петлей или пипеткой. После приготовления мазка петлю прокалывают, а пипетку помещают в дезинфицирующий раствор.

Высушивание мазка осуществляют при комнатной температуре или путем не сильного нагревания высоко над пламенем спиртовки. Следует

избегать сильного нагревания, т.к. это может привести к коагуляции белков и деформации клеток.

Фиксация мазка может быть выполнена двумя способами. Первый – термический (фламбирование), используют чаще всего. Для этого предметное стекло с микроорганизмами (мазком вверх) проносят несколько раз над пламенем спиртовки через наиболее горячую часть пламени. Второй – химический, используют путем нанесения химических растворов на мазок или помещая препараты в раствор фиксаторов. Чаще всего для этих целей используют формалин, спирты, ацетон. Фиксация необходима для инактивирования микроорганизмов, лучшего прикрепления мазка к стеклу и лучшего окрашивания препарата.

После фиксации приступают к окрашиванию препарата. Для этого его располагают на препаратодержателе над кристаллизатором и наносят один либо несколько красителей на определенное время. Далее препарат промывают водой из колбы. Воду льют тонкой не сильной струей до того времени, пока стекающая с предметного стекла вода не станет полностью прозрачной. Затем препарат переворачивают, удаляют излишки воды, протирают фильтровальной бумагой, высушивают и микроскопируют.

Для окрашивания микроорганизмов применяют основные и кислые красители. В основных красящим веществом (хромофором) является катион, который связывается с кислыми компонентами клетки. К этой группе относятся генциановый фиолетовый, основной фуксин, метиленовый синий, нейтральный красный, сафранин, малахитовый зеленый, сафранин. Основные красители в микробиологии используются чаще. В кислых красителях красящим веществом является анион. Примерами этой группы служат эозин, кислый фуксин, эритрозин, нигрозин.

По количеству используемых красителей окрашивание подразделяется на простое и сложное (дифференцированное). В первом случае используют какой-либо один краситель – генциановый фиолетовый, фуксин или метиленовый синий. Во втором используют несколько красителей, один из которых является основным, а другие – дополнительные, также применяют различные обесцвечивающие вещества: кислоты, спирты, воду. С помощью сложного вещества выявляют специфические клеточные структуры, включения.

По механизму окрашивания выделяют красители позитивные и негативные. Позитивные красители непосредственно окрашивают препарат: клетки микроорганизмов, фрагменты субстрата. Негативные красители окрашивают пространство между клетками микроорганизмов, образуя фон, а сами клетки микроорганизмов они не окрашивают.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте отличительные особенности прокариот.
2. Перечислите основные морфотипы бактерий и архей.
3. Укажите, каким должен быть правильно приготовленный мазок.
4. Назовите основные способы фиксации микробиологических препаратов.
5. Чем различаются между собой простое и сложное, позитивное и негативное окрашивание?

Лабораторная работа № 3 Окраска микроорганизмов по Граму

Окраска по методу Грама – позволяет различать бактерии по молекулярной и химической организации клеточной стенки. Сущность его в том, что в клетках одних микроорганизмов образуется стойкое соединение генцианового фиолетового с йодом, которое не вымывается спиртом, а у других видов это соединение временное, вымывается спиртом. К первой группе относятся представители родов *Bacillus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* – это грамположительные бактерии. К грамотрицательным бактериям относятся следующие роды и виды прокариот: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Neisseria*, *Erwinia*. Данный метод окрашивания является одним из наиболее используемых и важных для дифференциации прокариот. Окраска по Граму включает следующие этапы:

1. На фиксированный мазок наносят генциановый фиолетовый (или сверху на препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги и на нее наносят краситель) на 1 – 2 минуты.
2. Сливают краситель и, не промывая препарат водой, наносят на него реактив Люголя на 1 минуту до почернения.
3. Сливают реактив Люголя, не промывая водой, на окрашенный препарат наносим 96%-ный спирт (или помещают предметное стекло в стакан со спиртом) на 20 секунд.
4. Мазок промывают водой.
5. На препарат наносят фуксин на 1 – 2 минуты, после чего промывают водой.
6. Препарат высушивают и микроскопируют под иммерсией.

Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый, грамотрицательные – в розово-красный цвет. Для окрашивания по Граму рекомендуется использовать суточные культуры, так как способность удерживать краситель зависит от физиологических свойств клетки.

Лабораторная работа № 4 Окраска кислотоустойчивых бактерий

Для некоторых прокариот (*Mycobacterium*, *Actinomycetales*) характерно такое свойство, как кислотоустойчивость. Оно заключается в способности клеток трудно воспринимать красители и сохранении окраски после обработки кислотой. Кислотоустойчивость связана с особым химическим составом клеточных стенок: высоким содержанием в них сложных липидов и миколовых кислот.

Метод Циля – Нильсена:

1. На фиксированный в пламени мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, на который наносят раствор карболового фуксина по Цилю. Мазок с красителем 2–3 раза прогревают до появления паров, располагая его в пламени спиртовки (около 5 минут). Нельзя допускать закипания красителя, при образовании паров и подсыхании фуксина добавляют несколько капель раствора.

2. Препарату дают остыть, промывают водой.

3. Окрашенный мазок помещают в стакан с раствором 5%-ной H_2SO_4 или 3%-ной HCl 2 – 3 раза, не задерживая в кислоте.

4. Препарат промывают водой и наносят на него метиленовый синий Леффлера на 3 – 5 минут.

5. Препарат промывают водой, высушивают, микроскопируют с иммерсией.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, не кислотоустойчивые – в синий.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте строение муреина.
2. Чем отличаются между собой клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий?
3. Укажите отличительные особенности клеточной стенки бактерий группы *Mycolata*.
4. Охарактеризуйте строение клеточной стенки архей.
5. Назовите безоболочечные формы бактерий и перечислите их особенности и причины образования.
6. Почему окрашивание по Граму является дифференцированным?

Лабораторная работа № 5
Окраска капсулы бактерий.
Выявление цитоплазматических включений

Многие бактерии при особых условиях культивирования образуют капсулу – слизистое образование, прочно связанное с клеточной стенкой, имеющее четко очерченные внешние границы. Капсулы различаются по толщине и химическому составу, не являются обязательными компонентами клетки прокариот. Капсулообразующие бактерии формируют колонии с гладкой, блестящей, слизистой поверхностью (S-колонии). Капсулы выполняют защитную функцию, могут являться фактором вирулентности, участвуют в транспорте веществ, в адгезии клеток к субстрату и запасании питательных веществ.

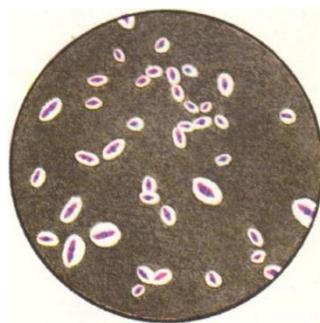


Рис. 1. – Капсулы бактерий

Для выявления капсул используют методы негативного контрастирования.

Метод Бури – Гинса:

1. На предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина и вносят в нее бактериологической петлей культуру исследуемых бактерий.
2. Рядом наносят каплю туши. Смешивают две капли и, протягивая ребром чистого предметного стекла по поверхности препарата, делают мазок.
3. Мазок высушивают на воздухе и микроскопируют под иммерсией. На темном фоне видны розовые клетки, окруженные бесцветной капсулой.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите функции капсул.
2. Классифицируйте капсулы по размеру и химическому составу.
3. Назовите бактерии, для которых характерно наличие капсул.
4. Охарактеризуйте структуру, химический состав и назовите представителей бактерий, которые имеют чехлы.
5. Охарактеризуйте структуру, химический состав и назовите представителей бактерий, которые имеют слизь в качестве компонента поверхностного аппарата.

Лабораторная работа № 6

Приготовление прижизненных препаратов и определение подвижности микроорганизмов

Прижизненные препараты микроорганизмов используются для изучения морфологии, способов и скорости размножения, особенностей спорообразования, выявления подвижности, наблюдения реакции на воздействие разнообразных химических и физических факторов. При изучении препаратов данной группы возможно использование «прижизненных» красителей – метиленового синего, нейтрального красного в очень низких концентрациях (0,001 – 0,0001%). Препараты живых клеток рассматривают, как правило, без использования иммерсионной системы. После окончания работы, изученные препараты помещают в дезинфицирующий раствор.

Препарат «раздавленная капля»:

1. На предметное стекло наносят каплю воды.
2. С плотной питательной среды берут исследуемую культуру, вносят ее в каплю воды и эмульгируют. Если микроорганизмы находятся в жидкой питательной среде, наносят каплю культуры на предметное стекло без предварительного добавления капли воды.
3. Накрывают препарат предметным стеклом, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

Препарат «висячая капля»:

1. Наносят каплю суспензии изучаемых микроорганизмов на покровное стекло.
2. Берут предметное стекло с лункой и обмазывают края углубления вазелином (для плотного прилегания, создания влажной камеры и предохранения от высыхания), избегая попадания вазелина в лунку.
3. Переворачивают покровное стекло каплей вниз и накладывают его на предметное стекло с лункой таким образом, чтобы капля исследуемой суспензии располагалась над центром лунки, не растекаясь и нависая над углублением.

Препарат «отпечаток»:

1. На плотную питательную среду с микроорганизмами кладут стерильное покровное стекло и слегка придавливают его бактериологической петлей или пинцетом, стараясь не сдвигать.
2. Покровное стекло отпечатком вниз помещают в каплю воды или красителя.
3. Для приготовления препарат можно использовать предметное стекло, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом.

Препарат «агаровая пленка»:

1. На стерильное предметное стекло наносят 0,2 – 0,3 мл агаризованной питательной среды и распределяют ее тонким слоем.

2. После застывания питательной среды бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в нее вносят суспензию исследуемых микроорганизмов.

3. Сверху помещают покровное стекло, лишнюю питательную среду убирают.

4. Для создания благоприятных условий щели между предметным и покровным стеклом заливают воском или парафином либо инкубируют полученный препарат во влажной камере (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги).

5. На таком препарате изучают способы размножения, процессы развития, так как не нарушается естественное расположение растущих клеток.

Определение подвижности микроорганизмов:

1. Стерильной бактериологической петлей вносят изучаемые микроорганизмы уколом в пробирку с полужидкой агаризованной питательной средой.

2. Пробирку закрывают стерильной пробкой и помещают в термостат на 24 – 48 часов.

3. Если рост микроорганизмов наблюдается только по линии укола, значит, они неподвижны. Подвижные бактерии будут распределены шире линии укола, выходят за пределы этой линии, вызывают диффузное помутнение питательной среды.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите способы активного и пассивного передвижения микроорганизмов.

2. Классифицируйте микроорганизмы по количеству и расположению жгутиков.

3. Охарактеризуйте общий план строения и механизм работы бактериального жгутика.

4. Назовите отличия между жгутиками грамположительных и грамотрицательных бактерий.

5. Что такое аксиальные фибриллы: охарактеризуйте их расположение, механизм работы и укажите, для кого они характерны.

6. Какие типы таксисов встречаются у микроорганизмов?

РАЗДЕЛ II

ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ СТРУКТУР.

НУКЛЕОИД. ЭНДОСПОРЫ

Цитоплазма представляет собой внутреннюю среду клетки. От поверхностных структур она отграничена цитоплазматической мембраной, состав и структура которой радикально отличаются у архей и всех остальных микроорганизмов. Генетические, метаболические, транспортные, регуляторные, коммуникационные процессы микроорганизмов связаны с цитоплазматической мембраной и ее производными.

Внутри цитоплазмы прокариот находится специфический цитоскелет, генетический аппарат, рибосомы, структуры, окруженные мембранами (аэросомы, карбоксисомы, магнитосомы), запасные питательные вещества. Для некоторых прокариот при наступлении неблагоприятных условий характерно образование покоящихся стадий, которые образуются внутриклеточно (эндоспоры) или из всей клетки (цисты, микроспоры, акинеты).

Лабораторная работа № 7 Окраска эндоспор бактерий

Эндоспоры формируются внутри вегетативных клеток бактерий, имеющих клеточную стенку грамположительного типа. В клетке образуется одна эндоспора, которая может располагаться в центре, субполярно или полярно. Образование споры насчитывает несколько стадий, которые объединяют в три основных этапа: подготовительный, формирование и созревание. От вегетативных клеток эндоспоры отличаются повышенным содержанием гидрофобных аминокислот, дипиколиновой кислоты, катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , низким уровнем метаболизма, меньшим содержанием ДНК, РНК и воды, а также повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям. Попадая в благоприятные условия, споры прорастают, из них образуются вегетативные клетки. Кроме того, можно искусственно вызвать их прорастание путем кратковременного кипячения или нагревания. Основная функция эндоспор – перенесение неблагоприятных условий.

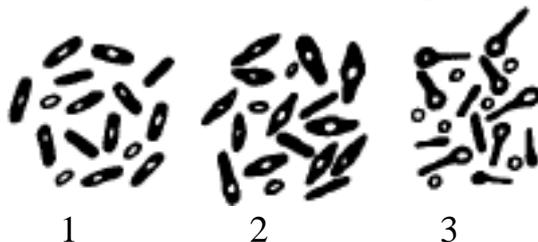


Рис. 2. – Типы спорообразования у бактерий:

1 – бациллярный; 2 – клостридиальный; 3 – плектридиальный

Существует несколько способов выявления эндоспор, для этого могут быть использованы как простые, так и сложные методы окраски.

Окраска по методу Шефера – Фултона:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5%-ный водный раствор малахитового зеленого и несколько раз нагревают в пламени спиртовки до появления паров.
2. Убирают фильтровальную бумагу, промывают препарат водой и на 30 секунд наносят раствор фуксина (или 0,5%-ного сафранина).
3. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют под иммерсией.

Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

Окраска по методу Пешкова:

1. На фиксированный в пламени мазок наносят раствор метиленового синего. Предметное стекло берут пинцетом, нагревают над пламенем спиртовки и после закипания красителя удерживают препарат в таком положении 10 – 20 секунд.
2. Предметное стекло кладут на препаратодержатель, дают ему остыть и промывают водой.
3. Наносят на препарат на 30 секунд 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного или сафранина.
4. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой

Споры окрашиваются в синий цвет, клетки – в красный.

Вопросы для самоконтроля

1. Для каких прокариот характерно образование эндоспор?
2. Назовите факторы, обеспечивающие гиперрезистентность эндоспор к неблагоприятным факторам среды.
3. Охарактеризуйте основные этапы спорогенеза.
4. Укажите структуры, отвечающие за прорастание споры.
5. Дайте краткую характеристику следующим покоящимся структурам: цисты, экзоспоры, акинеты, миксоспоры.

Лабораторная работа № 8

Окраска нуклеоида

Нуклеоид – генетический аппарат прокариот, является аналогом ядра, упакованный в компактную структуру и расположенный в определенном участке цитоплазмы, не имеющий ядерной мембраны. Представляет собой кольцевую двухцепочечную бактериальную хромосому, в которой сосредоточена генетическая информация. В большинстве случаев, в бактериальной клетке находится один нуклеоид, но иногда в экспоненциальной фазе роста

их число может достигать 20 – 25 копий (*Azotobacter chroococcum*). Также помимо кольцевой структуры у некоторых прокариот нуклеоид имеет линейную форму (*Streptomyces spp*, *Rhodococcus fasciens*). Бактериальная хромосома состоит из ДНК, которая стабилизирована полиаминами, катионами Mg^{2+} и специфическими белками. Помимо нуклеоида, носителями ДНК в бактериальных клетках являются IS-элементы, транспозоны, плазмиды. Репликация ДНК у бактерий осуществляется по полуконсервативному механизму.

Выявление нуклеоида – трудоемкий процесс, так как одновременно с нуклеоидом могут окрашиваться другие компоненты бактериальной клетки. Довольно хорошо нуклеоид окрашивается в клетках *Azotobacter chroococcum*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*.

Метод Романовского – Гимза:

1. Мазок суточной культуры высушивают на воздухе и фиксируют метанолом или жидкостью Карнуа в течение 5 минут.
2. После этого раствор опускают на 2 – 3 минуты в раствор 1н. HCl.
3. Затем препарат промывают водой, помещают в 1%-ный раствор формалина и наносят на мазок раствор основного фуксина на 1 – 2 минуты.
4. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой.

Цитоплазма окрашивается в розовый, нуклеоид – в ярко-малиновый цвет.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое нуклеоид?
2. Перечислите отличия между нуклеоидом прокариот и хромосомами эукариот.
3. Назовите бактерий, имеющих мультихромосомный геном. В чем заключается его значение?
4. Укажите и дайте краткую характеристику нехромосомных единиц наследственности прокариот.

Лабораторная работа № 9 Окраска цитоплазматических включений

Внутрицитоплазматические включения прокариот подразделяются на активно функционирующие и продукты клеточного метаболизма. К первой группе относятся хлоросомы, фикобилисомы, карбоксисомы, аэросомы, магнитосомы – структуры, участвующие в фотосинтезе, фиксации углекислого газа и таксисах. Ко второй группе относятся запасные вещества: полисахариды, полифосфаты, липиды, полипептиды, отложения серы.

Волютин – полифосфат, является фосфор- и азотсодержащим резервным веществом. У прокариот (*Bacillus subtilis*, *Spirillum volutans*) локализован в цитоплазме, у эукариот (*Saccharomyces spp*) – в вакуолях. Характерной особенностью волютина является метахромазия – приобретение цвета, отличного от красителя.

Метод окраски волютина по Нейссеру:

1. На фиксированный в пламени мазок наносят раствор метиленового синего по Нейссеру на 1 – 2 минуты.
2. Промывают препарат водой.
3. На мазок наносят раствор Люголя на 20 – 30 секунд.
4. Не промывая препарат водой, дополнительно наносят 2%-ный раствор везувина на 2 – 3 минуты.
5. Сливают краситель, промывают препарат водой, высушивают, микроскопируют с иммерсионной системой.

Цитоплазма окрашивается в желтый цвет, гранулы волютина – в темно-синий.

Метод окраски волютина по Омелянскому:

1. На фиксированный в пламени мазок наносят карболовый фуксин Циля на 0,5 – 1 минуту.
2. Сливают краситель, промывают препарат водой и наносят на него 1%-ный раствор H_2SO_4 на 20 – 30 секунд.
3. Сливают кислоту, промывают мазок водой и наносят водный раствор метиленового синего на 20 – 30 секунд.
4. Промывают препарат водой, высушивают, микроскопируют под иммерсией.

Цитоплазма окрашивается в синий цвет, гранулы волютина в – красный.

В клетках дрожжей волютин можно выявить следующим способом:

1. На фиксированный мазок наносят метиленовый синий Леффлера на 10 минут.
2. Краситель сливают, промывают препарат и микроскопируют, используя иммерсионную систему.

Клетки имеют голубой цвет, зерна волютина – фиолетово-красный.

Включения полисахаридной природы можно выявлять на прижизненных препаратах, используя раствор Люголя

1. На предметное стекло наносят каплю жидкой культуры микроорганизмов. Либо в каплю воды бактериологической петлей вносят микроорганизмы с плотной питательной среды и делают суспензию.
2. К капле суспензии добавляют каплю раствора Люголя.
3. Накрывают препарат покровным стеклом и микроскопируют.

Гликоген при окраске раствором Люголя легко выявляется у *Saccharomyces cerevisiae* и его гранулы имеют красно-коричневый цвет. Гранулы крахмалоподобного вещества – гранулезы окрашиваются в синий цвет и хорошо обнаруживаются у бактерий рода *Clostridium*.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие включения у прокариот относятся к активно функционирующим?
2. Для каких бактерий характерно наличие карбоксисом? В чем заключается их значение?
3. Охарактеризуйте значение азросом и магнитосом.
4. Какие вещества прокариот выполняют запасную функцию?

РАЗДЕЛ III РОСТ И ДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Культивирование и способы посева микроорганизмов.

На современном этапе развития микробиологии возможно культивирование менее 0,1% от общего числа микроорганизмов (Нетрусов, 2006), так как многие прокариоты являются симбионтами других организмов и обитают в специфических условиях, которые не легко воссоздать в лаборатории.

Выращивание микроорганизмов при определенных условиях в лаборатории – культивирование. Культивирование при определенной температуре называется инкубированием. Для инкубирования используют термостаты. Для культивирования строгих анаэробов используют анаэроостаты – приборы, создающие бескислородные условия. Выделяют два типа культивирования: периодическое (статическое) и непрерывное (проточное).

КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Культивирование микроорганизмов осуществляют на питательных средах. Питательные среды различаются по ряду признаков:

По химическому составу:

- натуральные (настой сена, фруктовые соки, молоко);
- полусинтетические (растительный экстракт с добавлением аминокислот и витаминов);
- синтетические (содержат химические соединения в точно указанных концентрациях).

По консистенции:

- жидкие (используют для накопления биомассы, сохранения культуры, исследования физиологии и биохимии);
- полужидкие (используют для изучения подвижности, культивирования микроаэрофилов);
- плотные (применяют для выделения чистых культур и описания колоний, сохранения культуры);
- сыпучие или сухие (находят применение в промышленной микробиологии для получения физиологически ценных соединений, среды удобны для хранения и транспортировки).

По назначению:

- обычные (простые) – для культивирования большинства микроорганизмов (МПА – мясопептонный агар);

- **элективные** – применяют для выделения определенной группы микроорганизмов из естественных условий и получения накопительной культуры, менее пригодны для развития других (среда Эшби – безазотистая питательная среда для культивирования азотфиксаторов);
- **дифференциально-диагностические** – позволяют отличить одни микроорганизмы от других на основе биохимических и физиологических особенностей (среда Эндо для выявления энтеробактерий).

СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация – полное уничтожение патогенных и сапрофитных форм микроорганизмов в материалах (Павлович, 2013). Питательные среды, инструменты, лабораторная посуда стерилизуются для проведения микробиологических исследований чтобы не допустить развития посторонних организмов. К термическим методам стерилизации относят прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация, автоклавирование, дробная стерилизация (тиндализация), кипячение, пастеризация. Среди методов холодной стерилизации применяются фильтрование, обработка химическими веществами, ультрафиолетовым и другими видами излучений.

Прокаливание и обжигание в пламени (фламбирование) – применяется для обеззараживания бактериологических петель, шпателей, ножниц, термостойчивых материалов.

Сухожаровая стерилизация осуществляется в специальных сухожаровых шкафах. Основана на использовании сухого горячего воздуха температурой 160 – 170 °С в течение 1 – 2 часов. Применяется для обеззараживания лабораторной посуды, пипеток и пробирок.

Автоклавирование – стерилизация насыщенным паром под давлением – наиболее надежный и часто применяемый способ очистки от микроорганизмов. Данный способ основан на одновременном воздействии высокой температуры и давления водяного пара, что обеспечивает особую эффективность этого процесса. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся котлах – автоклавах. Таким способом стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты. Надежной стерилизации достигают нагреванием до 121 °С, избыточном давлении 1,0 атм в течение 15 – 45 мин.

Дробная стерилизация (тиндализация) – способ обеззараживания питательных сред, портящихся при температурах выше 100 °С. В этом случае питательную среду нагревают до 100 °С и выдерживают эту температуру около 10 минут. Такие условия приводят к гибели вегетативных клеток, в питательной среде могут сохраниться только эндоспоры. После остывания питательную среду помещают в термостат при температуре 30 °С, что

приводит к прорастанию спор. Спустя некоторое время, питательную среду вновь нагревают до кипения, чтобы уничтожить проросшие споры. Этот цикл повторяют 3 – 4 раза.

Кипячение – способ обеззараживания лабораторной посуды, инструментов, мембранных фильтров путем погружения в кипящую воду на 30 – 60 минут.

Пастеризация относится к частичной или неполной стерилизации. Заключается в однократном нагревании при 55 – 65 °С в течение часа или при 70 – 80 °С за 5 – 10 минут. Приводит к гибели вегетативных клеток, применяется для обеззараживания продуктов питания с сохранением их вкусовых качеств.

Стерилизация фильтрованием применяется по отношению к веществам, не выдерживающим термической обработки. В качестве фильтров используют мелкопористые материалы, задерживающие клетки микроорганизмов. Для пропускания раствора через фильтр необходимо давление или вакуум.

Химические вещества, используемые для стерилизации, должны обладать бактерицидным действием. Это могут быть вещества различной химической природы: соли тяжелых металлов, галогены, спирты, перекиси, фенолы. При газовом методе стерилизации чаще всего используют невоспламеняющиеся смеси этилена с диоксидом углерода и хладонами, а при стерилизации растворами – перекись водорода, глутаровый альдегид, надуксусную и надмуравьиную перкислоты.

Стерилизация облучением используется для очистки помещений, оборудования, некоторых материалов. Используются ультрафиолетовые лампы с длиной волны 250 – 270 нм. Также может применяться рентгеновское и γ -облучение для стерилизации больничных помещений, препаратов, оборудования и материалов.

ТИПЫ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ. СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

В отношении микроорганизмов выделяют следующие типы культур: смешанные, накопительные, чистые.

Смешанные культуры – культуры микроорганизмов, включающие два и более вида, встречаются в естественных условиях обитания, различаются качественным и количественным составом.

Накопительные культуры – культуры, в которых преобладают организмы определенной экологической группы. Например, анаэробы в глубоких слоях почвы.

Чистая культура – культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида. Именно чистые культуры бактерий используют для изучения

цитологических, физиологических и биохимических особенностей. Однако в естественных условиях микроорганизмы представляют собой многовидовые сообщества – смешанные культуры, из которых отбирают определенные виды.

Выделение чистой культуры включает следующие этапы: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и определение ее чистоты.

Получение накопительной культуры предполагает создание селективных условий, предложенных С.Н. Виноградским, которые стимулируют развитие одних и подавляют развитие других групп микроорганизмов. Из мест обитания, в которых живут определенные микробы, делают посев на подготовленную селективную среду. Для этого могут быть использованы физические, химические и биологические методы. К физическим относятся: использование освещения (для получения культур цианобактерий), инкубирование при высокой или низкой температуре (для получения культур термо- или психрофилов), применение пастеризации (для выделения споробразующих бактерий). Создание селективных условий химическими методами включает в себя применение кислородных или бескислородных условий (для выращивания аэробов или анаэробов), поддержание рН питательной среды на определенном уровне (для культивирования ацидофилов, алкалофилов или нейтрофилов), использование безазотистых питательных сред (для получения культуры азотфиксаторов) или использование CO_2 в качестве единственного источника углерода (для микроорганизмов-автотрофов), применение антибиотиков для подавления роста определенных микробов (пенициллин в концентрации 0,2 – 100 мкг/л для накопления грамотрицательных бактерий). К биологическим методам относятся получение накопительных культур с использованием заражения подопытных животных (выделение патогенных микроорганизмов), выращивание одних бактерий в качестве субстрата для поселения или хозяина для других (бактерии *Bdellovibrio* паразитируют на представителях семейства *Enterobacteriaceae*).

Чаще всего, получение накопительной культуры требует применения комплекса различных методов. Например, для получения культуры пурпурных серных бактерий необходимо создать анаэробные условия, в качестве источника энергии использовать солнечный свет, вводить CO_2 в качестве единственного источника углерода и поддерживать высокую концентрацию сульфида серы.

Признаками развития накопительной культуры является помутнение среды, появление пленки, осадка, образование пигментации, выделение газов. После получения накопительной культуры переходят к выделению чистой культуры. Для получения чистой культуры аэробных микроорганизмов используют рассев шпателем или рассев петлей.

Рассев шпателем. На плотную агаризованную питательную среду наносят определенный объем накопительной культуры и распределяют ее

по поверхности среды стерильным шпателем, вращая чашку Петри, после чего закрывают ее крышкой. Далее шпатель не стерилизуют, а быстро переносят его в новую чашку, проводят им по новой питательной среде и закрывают чашку крышкой. Аналогичные действия проводят для третьей чашки и стерилизуют шпатель. Ставят чашки инкубироваться и спустя какое-то время проводят учет микроорганизмов. Как правило, в первой чашке наблюдается сплошной рост, а в третьей формируются изолированные колонии. Эти колонии отбирают петлей и пересевают для последующего анализа.

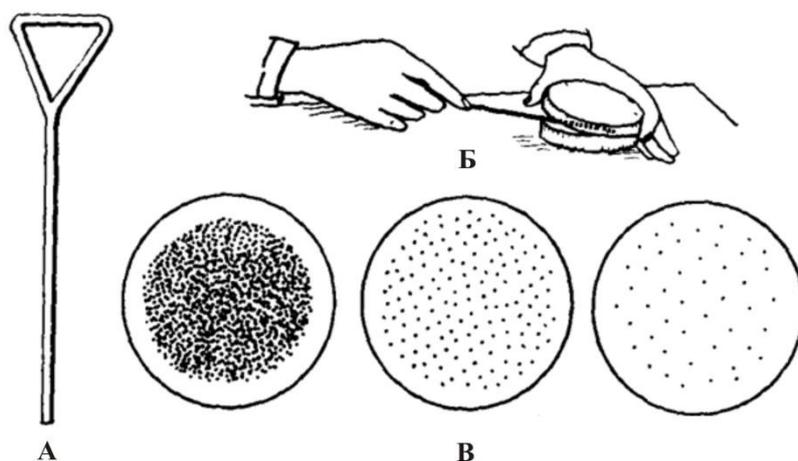


Рис. 3. – Рассев культуры микроорганизмов шпателем:
 А – шпатель Дригальского; Б – рассев;
 В – рост микроорганизмов после посева

Рассев петлей (метод истощающего штриха). Простерилизованной бактериологической петлей отбирают микроорганизмы из накопительной культуры и проводят ей по поверхности агаризованной питательной среды в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым штрихом (Б, В, Г) петлю прокаливают. После посева чашку инкубируют в термостате, после чего проводят анализ роста микроорганизмов. На первых штрихах наблюдаются сплошные линии роста, на штрихах В и Г появляются изолированные колонии, которые в дальнейшем пересевают и используют для изучения.

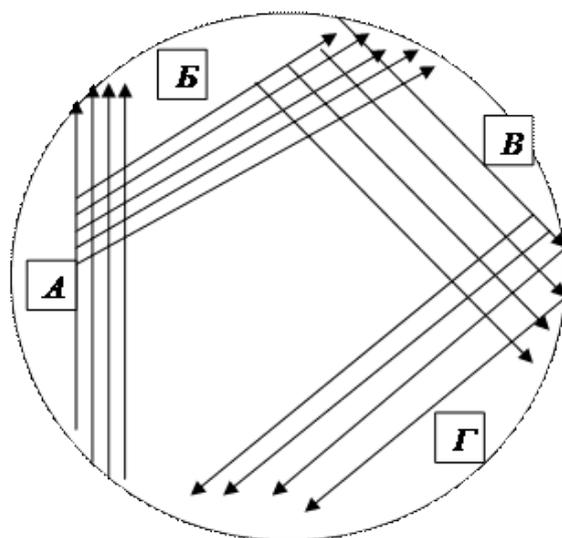


Рис. 4. – Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Чистота полученной культуры микроорганизмов проверяется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле оценивают рост микроорганизмов на поверхности скошенного агара – если рост неоднороден по линии нанесения, скорее всего культура загрязнена и требует дополнительной очистки. Под микроскопическим контролем понимают приготовление фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов – клетки, принадлежащие одному виду должны быть однородными по морфологии и окрашиванию. Но следует учитывать, что некоторые виды бактерий являются плеоморфными и грамвариабельными. Третий способ контроля чистоты культуры – высев на соответствующие питательные среды – определяет возможность роста микроорганизмов на средах с различными источниками и концентрациями химических элементов. Отсутствие или однородность характера роста колоний является свидетельством чистоты выделенной культуры.

Лабораторная работа № 10 **Посев и пересев микроорганизмов.** **Описание колоний микроорганизмов**

Внесение культуры исследуемого микроорганизма из исследуемого материала в стерильную питательную среду называется посевом. Пересевом называется перенос выращенных микроорганизмов из одной питательной среды в другую. Эти действия необходимо проводить, используя стерильные инструменты рядом с пламенем горелки. В зависимости от целей и типа питательных сред выделяют различные методики посева, но все они имеют схожие начальные этапы. В самом начале мы берем в правую руку бактериологическую петлю и прокаливаем ее. Затем мы берем пробирку с культурой

микроорганизмов в левую руку, держим ее горизонтально таким образом, чтобы хорошо видеть расположение объектов изучения. После этого, мизинцем правой руки мы достаем пробку из пробирки, прогреваем края пробирки, вводим внутрь простерилизованную бактериологическую петлю, на несколько секунд прижимаем петлю к стенке пробирки для охлаждения и отбираем какое-то количество микроорганизмов. Далее достаем петлю из пробирки, прогреваем над спиртовкой горлышко пробирки, пробку, закрываем пробирку и ставим ее в штатив. Следующее действие – внесение микроорганизмов петлей на новую питательную среду. В конце необходимо простерилизовать бактериологическую петлю, чтобы удалить оставшиеся бактерии.

Посев на скошенный агар. Отобранные микроорганизмы микробиологической петлей вносят ко дну пробирку, и слегка прикасаясь к среде, проводят зигзагообразную линию снизу вверх. Данный способ используется для накопления биомассы, описания характера роста (сплошной, диффузный, перистый, однородный, скудный) и оптических свойств микробов (цвет, консистенция).

Посев на поверхность питательной среды в чашках Петри. Используется для накопления биомассы, описания колоний, выделения чистых культур, идентификации микроорганизмов. Посев можно осуществлять бактериологической петлей, микробиологическим шпателем Дригальского, а также методом реплик. В первом случае мы отбираем петлей культуру микроорганизмов и наносим ей штрихи по поверхности питательной среды (рис.3). Второй способ используется для посева микробов из жидкой культуры: наносят определенный объем содержащей бактерии суспензии и распределяют ее стерильным шпателем по поверхности агаризованной питательной среды, при этом вращая чашку Петри (рис.4). При посеве методом реплик используют определенную ткань (бархат с коротким жестким ворсом) – ее прижимают к среде с микроорганизмами, после чего прикладывают к стерильной питательной среде. В конце каждого из способов закрывают чашку Петри крышкой, и помещают чашки с посевами крышкой вниз.

Метод глубинного посева. Используется для культивирования микроаэрофильных и факультативно анаэробных микроорганизмов. Для этого в пробирки разливают питательную среду, стерилизуют, затем нагревают на водяной бане до температуры 48 – 50 °С, открывают пробку, прогревают края пробирки над спиртовкой и вносят стерильной пипеткой определенный объем суспензии микроорганизмов. Перемешивают содержимое, вращая пробирку между ладонями. Затем открывают пробирку, прогревают ее края над пламенем спиртовки и выливают питательную среду в приготовленную чашку Петри. Дают питательной среде застыть и помещают в термостат крышкой вниз.

Посев уколом. Осуществляют в полужидких средах (0,1 – 0,4% агара) для культивирования микроаэрофильных микроорганизмов, хранения культур, изучения подвижности. Для этого бактериологическую петлю

с микробами вносят в пробирку и вводят в центральную часть столбика с питательной средой, после чего прогревают края пробирки, пробку, закрывают пробирку и ставят в термостат.

При посеве в жидкую питательную среду отбирают микроорганизмов простерилизованной бактериологической петлей или пипеткой их вносят в новую жидкую питательную среду. Культивируя микробы таким способом, отмечают наличие пигментации, образование газов, характер осадка, степень помутнения, формирование пленки на поверхности.

Колония – скопление клеток одного вида микроорганизмов, выросшее из одной клетки. Для характеристики колоний на поверхности плотной питательной среды учитывается ряд признаков:

1. Размер (диаметр) колонии в миллиметрах (10 мм и более – крупная, от 1 до 10 мм – средняя, не более 1мм – точечная);
2. Оптические свойства (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая);
3. Цвет или пигментация, выделение цвета в субстрат;
4. Форма (рис. 5);
5. Профиль (рис. 6);
6. Форма края (рис. 7). Для рассмотрения формы края использовать микроскоп с малым увеличением;
7. Поверхность (гладкая, неровная, шероховатая, исчерченная, гранулированная и т.д.);
8. Консистенция (определяется прикосновением петлей: мукоидная (слизистая), вязкая, маслянистая, сухая, тянущаяся);
9. Структура (рис. 8).

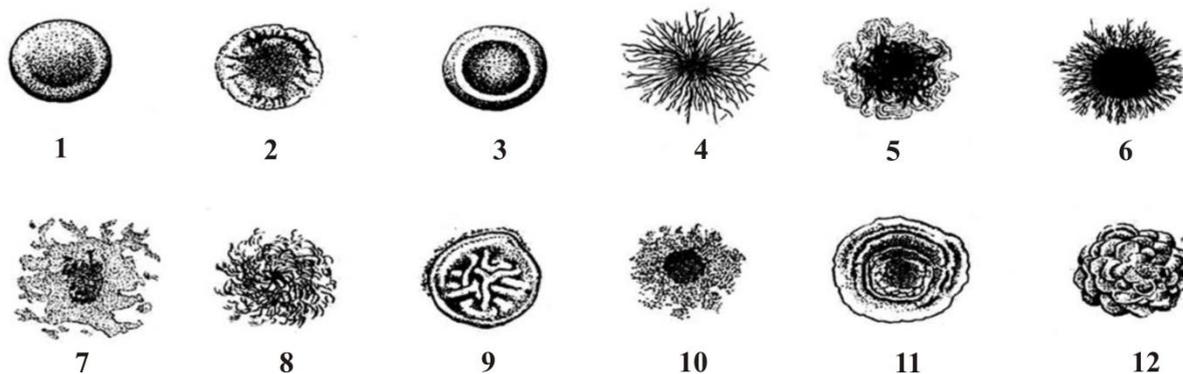


Рис. 5. – Форма колоний:

- 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем;
 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем;
 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная;
 11 – concentрическая; 12 – сложная



Рис. 6. – Профиль колоний:

- 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый;
 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый;
 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

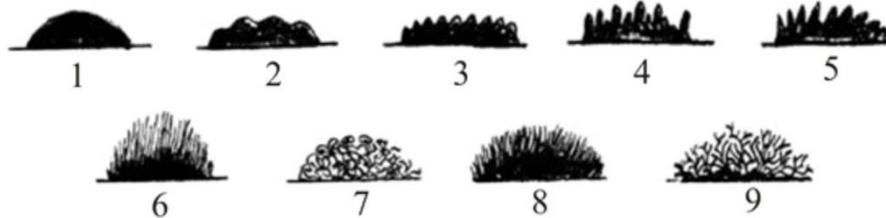


Рис. 7. –Характер края колоний:

- 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной;
 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый;
 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

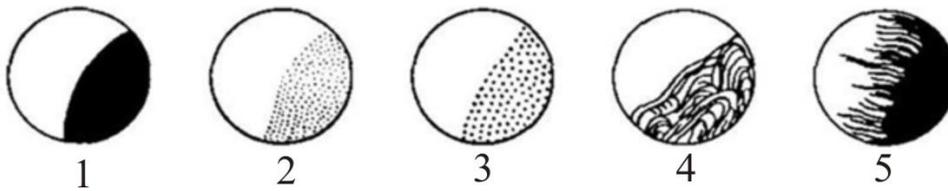


Рис. 8. – Структура колоний:

- 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая;
 5 – волокнистая

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое питательная среда?
2. Классифицируйте и охарактеризуйте питательные среды по составу, консистенции, назначению.
3. Что такое культура микроорганизмов? Какие типы культур выделяют?
4. Что такое стерилизация? Перечислите известные вам способы стерилизации.
5. Назовите несколько способов посева микроорганизмов.

Лабораторная работа № 11

Учет численности микроорганизмов

Численность микроорганизмов и их биомасса являются важнейшими санитарными показателями различных сообществ сред жизни. Количество клеток микроорганизмов в определенном объеме называется титр. Методы определения численности подразделяются на прямые и косвенные. Прямые являются более точными и подразумевают непосредственный подсчет клеток. Косвенные методы направлены на учет показателей, зависящих от количества или биомассы микроорганизмов: число колоний, выросшее на питательной среде, оптической плотности суспензии исследуемой культуры, содержания какого-либо химического вещества (белка, ДНК).

Подсчет клеток в счетных камерах. Используется для определения численности крупных микроорганизмов (дрожжей, водорослей, простейших). Учет численности проводится в камере Горяева – Тома. Это толстое предметное стекло, в центральной части которого нанесена сетка. Площадь больших и малых квадратов сетки $1/25 \text{ мм}^2$ и $1/400 \text{ мм}^2$ соответственно. Глубина камеры $0,1 \text{ мм}$.

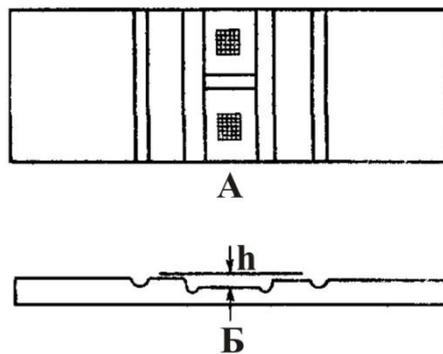


Рис. 9. – Счетная камера Горяева – Тома:
А – вид сверху; Б – вид сбоку

Перед началом работы углубление камеры накрывают специальным шлифованным покровным стеклом и прижимают его, двигая в противоположные стороны. После этого вводят исследуемую суспензию. Камеру Горяева – Тома помещают на предметный столик микроскопа и считают клетки микроорганизмов при увеличении объектива $\times 10$ или $\times 40$. Подсчет клеток проводят в 10 больших или 20 малых квадратах, двигаясь по диагонали. При этом количество клеток в больших квадратах не должно превышать 20, а в малых – 10. Если наблюдается превышение, жидкость с тест-объектами дополнительно разводят. Число клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемой суспензии определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^3 \times n}{hS},$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате сетки; 10^3 – коэффициент перевода в см^3 , n – коэффициент разведения исследуемой суспензии; h – глубина камеры; S – площадь квадрата сетки.

Подсчет клеток в окрашенных препаратах (метод Виноградского – Брида). Метод используется для подсчета микроорганизмов в естественных субстратах. На обезжиренном предметном стекле, которое располагают на миллиметровой бумаге, с помощью маркера наносят рамку определенного размера (2, 4, 6 см^2). Затем в эту рамку наносят известный объем суспензии с микроорганизмами. Жидкость распределяют в пределах отмеченной рамки бактериологической петлей, высушивают препарат на воздухе, после чего фиксируют 10 – 20 минут 96%-ным этанолом. Далее препарат окрашивают 1 – 2 минуты (фуксином, метиленовым синим или другим красителем). После этого краситель сливают, препарат промывают, последовательно погружая стекло в 5 – 6 сосудов с водой и высушивают на воздухе. Клетки микроорганизмов подсчитывают при помощи иммерсионного объектива $\times 90$ в квадратах окулярной сетки или полях зрения. Площадь квадрата сетки или поля зрения определяют с помощью объект-микрометра. Подсчеты производят в 50 – 100 полях зрения, при этом общее количество обнаруженных клеток должно быть не менее 600. Число клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times S}{V \times s} \times n,$$

где M – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); S – площадь мазка, мкм^2 ; n – коэффициент разведения исследуемой суспензии; V – объем нанесенной суспензии; s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мкм^2 .

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Данный метод используется для определения численности клеток в субстратах, с низким содержанием микроорганизмов, а также санитарно-микробиологических исследованиях. Для подсчетов используются фильтры, размер пор которых позволяет задерживать все микроорганизмы, содержащиеся в изучаемом субстрате. Стерильный фильтр помещают на фильтродержатель подготовленного вакуумного насоса. Через фильтр пропускают известный объем исследуемого материала. После чего фильтр снимают и проводят дальнейшие действия. Для определения количества осевших клеток осуществляют окрашивание 5%-ным карболовым эритрозином. Для этого фильтр нижней стороной помещают в чашку Петри, в которой находится фильтровальная бумага, увлажненная красителем. Чашку закрывают и оставляют на 1 час. Затем фильтр отмывают от красителя,

последовательно перенося его в чашки Петри с фильтровальной бумагой, увлажненной водой, до того момента, пока бумага не перестанет окрашиваться. Далее фильтр высушивают на воздухе и готовят препарат: на предметное стекло наносят иммерсионное масло и кладут фильтр, на его поверхность добавляют каплю иммерсионного масла и накрывают покровным стеклом. Клетки микроорганизмов подсчитывают при помощи иммерсионного объектива $\times 90$ в квадратах окулярной сетки или полях зрения как в методе Виноградского – Брида. Число клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times F \times 10^6}{V \times s},$$

где M – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); F – площадь мембранного фильтра, мм^2 ; V – объем профильтрованной жидкости, мл; s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм^2 ; 10^6 – коэффициент перевода мм^2 в мкм^2 .

Для определения количества жизнеспособных клеток, фильтр с микроорганизмами помещают на питательную среду, и по количеству выросших колоний судят о числе жизнеспособных клеток. Также подсчет и оценку количества, численность определенных групп и число жизнеспособных клеток можно осуществлять при помощи люминесцентной микроскопии. Для этого используются различные флуорохромы. Например, при окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные и нежизнеспособные клетки будут иметь различный цвет.

Определение количества жизнеспособных клеток путем посева на плотные питательные среды (чашечный метод Коха). Метод применяется для определения численности микроорганизмов в естественных субстратах и лабораторных культурах. Основан на постулате Коха, согласно которому, каждая колония является потомством одной клетки. Данный метод включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду, подсчет колоний (рис. 11).

Для приготовления разведений используют физиологический раствор. Готовят серию разведений, где каждая следующая пробирка будет содержать количество микроорганизмов в 10 раз меньше предыдущей. В стерильные пробирки наливают по 9 мл стерильного физраствора. После чего в первую пробирку добавляют стерильной 1 мл исследуемой суспензии. Ее тщательно перемешивают, после чего берут новой стерильной пипеткой 1 мл жидкости из первой пробирки и вносят во вторую пробирку. Далее эти действия повторяют по отношению ко второй, третьей и всем остальным пробиркам. Степень разведения зависит от плотности

популяции исследуемых микроорганизмов: чем она выше, тем больше разведений готовят.

Посев в основном проводят из трех последних пробирок. Для этого на подсушенную питательную среду из пробирки стерильной пипеткой наносят 0,1 мл суспензии и распределяют ее стерильным шпателем. Из каждого разведения посев делается одновременно на две чашки, при этом используются стерильные инструменты. Чашки закрывают крышками и помещают в термостат на сутки.

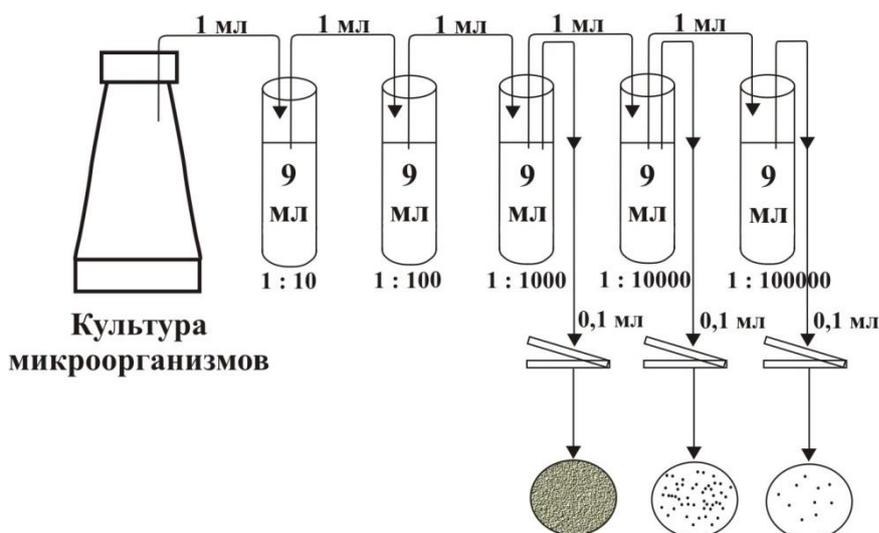


Рис. 10. – Схема постановки эксперимента по определению количества жизнеспособных бактерий чашечным методом Коха

Спустя отведенное время подсчитывают выросшие колонии. Учитывают результаты каждого разведения на обеих чашках, определяя среднее число колоний. Для определения общего количества клеток следует учитывать те разведения, при посеве которых на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Количество клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V},$$

где M – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее количество колоний на чашке Петри при высевах разведения; 10^n – коэффициент разведения, соответствующий номеру пробирки, из которой сделан высев; V – объем суспензии, отобранной для посева мл.

Определение количества микробных клеток нефелометрическим методом. Данный метод широко используется в лабораторных исследованиях, так как позволяет быстро и эффективно определить концентрацию клеток в исследуемой суспензии. В основе метода лежит измерение ослабления пучка света при его прохождении через суспензию

клеток: чем больше клеток, тем сильнее рассеивание пучка света. Изменение интенсивности света фиксируют при помощи нефелометра, спектрофотометра или фотоэлектроколориметра при длине волны 540 – 650 нм. Чаще всего строят калибровочные кривые, отражающие зависимость между концентрацией клеток и степенью рассеивания света. Для этого определяют оптическую плотность суспензий с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют одним из доступных методов количество клеток в единице объема. Найденную зависимость отражают графически.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте клеточные циклы микроорганизмов: мономорфный, диморфный, полиморфный.
2. Перечислите способы горизонтального переноса генетической информации у прокариот.
3. Что такое оперон? Выделите основные отличия в организации генетической информации у прокариот и эукариот.
4. Охарактеризуйте механизмы межклеточных коммуникаций у бактериальных клеток.

ПРИМЕРНЫЕ ТЕМЫ ДОКЛАДОВ-ПРЕЗЕНТАЦИЙ В РАМКАХ КУСР

1. Открытия и достижения Л. Пастера в микробиологии.
2. Вклад русских ученых в процесс формирования микробиологической науки. Основные направления микробиологических исследований в Беларуси.
3. Значение микроорганизмов для народного хозяйства и охраны здоровья.
4. Значение микроорганизмов в природе.
5. Строение и функции клеточной стенки коринебактерий.
6. Микобактерии как возбудители заболеваний человека.
7. Постоянные и временные структуры бактериальной клетки.
8. Реконструкция эволюции жгутикового аппарата бактерий
9. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембраны.
10. Способы размножения прокариот.
11. Плазмиды, транспозоны, IS-элементы прокариот.
12. Внутриклеточные включения хемолитотрофных бактерий и их роль в формировании геологических отложений.
13. Использование спорообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis* в сельском хозяйстве
14. Биогеохимическая деятельность микроорганизмов.
15. Плазмиды бактерий.
16. Принцип доменной организации «свернутой» хромосомы бактериальной клетки
17. Механизмы репарации генетического аппарата у микроорганизмов.
18. Мутанты бактерий и методы их выделения.
19. Актиномицеты.
20. Энтеробактерии.
21. Отличия архей от бактерий.
22. Нитратредуцирующие бактерии.
23. Метаногенные бактерии
24. Способы размножения прокариот.
25. Экзоспоры, микроспоры, цисты, акинеты.
26. Планктомицеты.
27. Механизмы межклеточных коммуникаций у бактериальных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – Т. 1. – 446 с. : ил.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – Т. 2. – 472 с. : ил.

Дополнительный

1. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М. : Издат. центр «Академия», 2003.
2. Лысак, В. В. Микробиология / В. В. Лысак. Минск : БГУ, 2008.
3. Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. М., 2006.
4. Царенко, Т. М. Микробиология. Практикум / Т. М. Царенко. – Витебск : Издательство УО «ВГУ имени П.М. Машерова», 2005. – 69 с.
5. Альберт, С. Б. Молекулярная биология клетки : в 3 т./ С. Б. Альберт [и др.]. М. : Мир, 1994. Т. 1–3.
6. Белясова, Н. А. Микробиология / Н. А. Белясова. Минск : БГТУ, 2005.
7. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М. : Изд-во МГУ, 1995.
8. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М. : Мир, 2002.
9. Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елимов. М. : Высш. шк., 1989.
10. Квасников, Е. И. Биология молочнокислых бактерий / Е. И. Квасников. Ташкент, 2000.
11. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.
12. Лысак, В. В. Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. – Минск : БГУ, 2016. – 80 с.
13. Лысак, В. В. Физиология микроорганизмов : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – 210 с.
14. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]. М. : Издат. центр Академия, 2005.
15. Нестеренко, О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования / О. А. Нестеренко. М., 1995.
16. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. /под ред. Дж. Хоулта [и др.]. М. : Мир, 1997. Т. 1–2.

17. Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.
18. Сиротин, А. А. Практикум по микробиологии / А. А. Сиротин. – Белгород : Изд-во БелГУ, 2007. – 80 с.
19. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. Колос, 1993. – 175 с.: ил.
20. Стейниер, Р. Мир микробов : в 2 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М., 1979. 2 т.
21. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. М. : Мир, 1987.
22. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology / ed.-in-chief G. M. Garrity. N. Y. : Springer, 2001–2003. Vol.1–5.

Учебное издание

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ**

Методические рекомендации

Составитель

ЛАТЫШЕВ Сергей Эдуардович

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Е.А. Барышева

Подписано в печать 03.03.2026. Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,50. Уч.-изд. л. 1,76. Тираж 9 экз. Заказ 12.

Издатель и полиграфическое исполнение — учреждение образования

«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,

изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования

«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.