

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии
и ветеринарно-санитарной экспертизы

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий
по дисциплине «Микробиология» со студентами,
обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния»



БРЯНСК 2024

УДК 579 (076)
ББК 28.4
М 79

Морфология микроорганизмов: учебно-методическое пособие для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология» со студентами, обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния» / авт.-сост. А. Е. Рябичева, Н. С. Андрюшина. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2024. - 56 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины «Микробиология» для проведения лабораторных занятий со студентами, обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния»

Рецензенты:

Е.Е. Адельгейм, доцент кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных БГАУ

В.И. Ивашин, директор ГБУ Брянской области «Дубровская зональная ветлаборатория»

Рекомендовано к изданию решением методической комиссии института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянской ГАУ от 21 ноября 2024 года протокол № 3.

© Брянский ГАУ, 2024

© Рябичева А.Е., 2024

© Андрюшина Н.С., 2024

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Введение | 4 |
| Тема 1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Изучение устройства микроскопа и правила работы с ним. Систематика микроорганизмов. Морфология палочковидных, кокков и извитых | 5 |
| Тема 2. Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, грибов | 22 |
| Тема 3. Строение бактериальной клетки | 32 |
| Тема 4. Методы приготовления препаратов микроорганизмов. Приготовление красителей. Методы окрашивания микроорганизмов | 43 |
| Список использованной литературы | 55 |

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология (от греч. «mikros» – малый, «bios» – жизнь, «logos» – учение) – наука, изучающая мир мельчайших живых существ – микроорганизмов и процессы, вызываемые микроорганизмами.

Микробиология изучает морфологию микроорганизмов, закономерности их развития и процессы, которые они вызывают в среде обитания, а также их роль в природе и хозяйственной деятельности человека.

К миру микроорганизмов относятся бактерии, дрожжи, микроскопические (плесневые) грибы.

Микроорганизмы – это наиболее древние формы жизни на Земле. Они появились задолго до возникновения растительного и животного мира. Мир микроорганизмов весьма многочислен и разнообразен. Среди микроорганизмов выделяют клеточные и неклеточные формы. К клеточным формам относятся эукариоты и прокариоты, а к неклеточным – вирусы. Все микроорганизмы, имеющие единую структурную организацию клеток, объединены в одно царство.

Микроорганизмы обитают во всех климатических зонах, находятся на всех предметах и продуктах, живут в организме человека. Они разлагают остатки отмерших животных и растительных тканей, выполняя роль санитаров планеты. С жизнедеятельностью микроорганизмов связаны образование полезных ископаемых, плодородие почвы, самоочищение водоемов и т.д. Полезные свойства микроорганизмов используются в технологии производства многих пищевых продуктов и различных биологически активных веществ, таких как ферменты, аминокислоты, витамины, антибиотики и др.

Однако не все микроорганизмы приносят пользу. Многие микроорганизмы являются вредителями пищевых производств и вызывают порчу пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья. Некоторые микроорганизмы, развиваясь и размножаясь в пищевых продуктах, образуют токсины и вызывают пищевые отравления.

В результате освоения раздела студент должен знать: технику безопасности при работе в микробиологической лаборатории, морфологию основных форм бактерий, строение бактериологической клетки, основные способы микроскопического анализа.

ТЕМА 1

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ИЗУЧЕНИЕ УСТРОЙСТВА МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ. СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ. МОРФОЛОГИЯ ПАЛОЧКОВИДНЫХ, КОККОВ И ИЗВИТЫХ

Цель занятия: ознакомить студентов с правилами работы и оборудованием микробиологической лаборатории, устройством светового микроскопа, его характеристиками и правилами работы с ним, изучить основные формы микроорганизмов.

Материалы и оборудование: автоклавы, термостаты, шкафы сухожаровые, микроскопы, холодильники, весы технические, аппарат Кротова для анализа микрофлоры воздуха помещений, прибор для подсчета колоний микроорганизмов, анаэроустат для культивирования анаэробных бактерий, рН-метр, петли и иглы бактериологические, шпатели Дригальского, ножницы, пинцеты, штативы, посуда лабораторная (чашки Петри, пробирки, пипетки – чаще всего на 1,0 и 0,1 см³, предметные и покровные стекла, флаконы для красок и растворов), вата, марля, красители для окраски бактерий, микроскопы, обезжиренные предметные стекла, фильтровальная бумага, культуры бактерий на питательных средах, мазки из культур различных микроорганизмов (палочковидных, шаровидных, извитых), плакаты.

Содержание и методика работы

Правила работы в микробиологической лаборатории

Специфика работы в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения порядка и чистоты. В связи с этим при работе в лаборатории необходимо соблюдать следующие правила.

1. Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головном уборе, вносить посторонние вещи.
2. Запрещается находиться в лаборатории в период обработки воздуха помещения ультрафиолетовыми лампами.
3. Перед занятиями необходимо надеть хлопчатобумажный халат.
4. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.
5. Нельзя класть на лабораторный стол личные вещи (сумки, папки и др.), их следует держать на специально отведенных местах.
6. В лаборатории запрещается принимать пищу, пить воду, не допускаются излишние разговоры и хождения.
7. На лабораторном столе не должно быть никаких лишних предметов, не имеющих отношения к работе.
8. Соблюдать осторожность при работе с открытым огнем спиртовки или газовой горелки.
9. Во избежание распыления спор микроорганизмов не допускается оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами плесневых гри-

бов, часто являющихся аллергенами.

10. Суспензии микроорганизмов набирают только с помощью груши или дозирующего устройства.

11. Перед использованием лабораторной посуды, пипеток, оборудования проверить целостность и исправность.

12. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла следует опускать в раствор с дезинфицирующей жидкостью.

13. В конце занятий следует привести в порядок рабочее место:

– засеянные чашки Петри или пробирки, культуры микроорганизмов сдать лаборанту;

– снять масло с иммерсионного объектива микроскопа фильтровальной бумагой, смоченной бензином, с помощью револьверной насадки установить над столиком объектив 8х, подложить под него мягкую ткань и поставить микроскоп на место;

– вымыть посуду, протереть рабочий стол дезинфицирующим средством (70% р-р спирта).

14. Дежурному по группе следует проверить рабочие места студентов.

Оборудование микробиологической лаборатории

Микробиологическая лаборатория должна включать следующие помещения:

- лабораторные комнаты для проведения исследований;
- застекленный ламинарный бокс для выполнения работ, требующих соблюдения повышенной стерильности;
- моечную, оборудованную для мытья посуды;
- препараторскую, приспособленную для приготовления питательных сред, подготовки посуды для стерилизации, приготовления реактивов;
- отделение для стерилизации, в котором установлены автоклавы.

Все помещения лаборатории должны иметь хорошее естественное и искусственное освещение. Поверхность столов и полы покрывают легко моющимся материалом (пластик, линолеум); в боксе, автоклавной и моечной стены и полы покрывают плиткой. Для стерилизации воздуха в помещениях лаборатории устанавливают бактерицидные лампы (БУВ-15, БУВ-30 и др.)

Требования к действиям при ликвидации аварий во время работы с биологическим материалом

1. При каждой организации, проводящей работу с возбудителями I-II групп патогенности, должен быть изолятор для сотрудников на случай обнаружения у них симптомов вероятных на заболевание и допустивших аварию.

2. В изоляторе предусматривается запас основных и резервных специфических лекарственных препаратов, медикаментов для оказания помощи по жизненным показаниям (кардиологических, противошоковых, антидотов) и дезинфицирующих средств.

3. При авариях во время работы с инфекционным материалом, ее немедленно прекращают и включают аварийную сигнализацию.

4. В случае возникновения аварии с разбрызгиванием инфекционного материала, вся проводящаяся работа в комнате прекращается. Защитную одежду (начиная с косынки или шлема) погружают в дезинфицирующий раствор или помещают в бикс (бак) для автоклавирования. В глаза, нос закапывают растворы антибиотиков, к которым чувствителен возбудитель. В случае аварии, при работе с возбудителями глубоких микозов, в глаза и нос закапывают 1 % борную кислоту, рот и горло прополаскивают 70° этиловым спиртом.

5. При аварии с ботулиническим токсином глаза и рот промывают водой и антитоксической сывороткой, разведенной до 10 международных единиц в 1 миллилитре. При попадании ботулинического токсина на открытые участки кожи смывают его большим количеством воды с мылом.

6. Если авария произошла при работе с неизвестным возбудителем, проводится профилактическое лечение антибиотиками широкого спектра действия.

7. Если авария произошла без разбрызгивания биологического материала, накладывают тампон (салфетку) с дезинфицирующим раствором на место соприкосновения биологического материала с поверхностью оборудования.

8. Если авария произошла в боксе (или БББ) – прекращают работу, на место попадания материала накладывают салфетки, обильно смоченные дезинфицирующим раствором. В боксе включают на 30 минут бактерицидные облучатели, включают аварийную сигнализацию, затем проводят дезинфекцию. Вытяжная вентиляция во время аварии и дезинфекции должна оставаться включенной.

9. Если авария связана с ранением или другим нарушением целостности кожных покровов:

1) работу прекращают, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором, снимают перчатку и выдавливают из ранки кровь в дезинфицирующий раствор, на место ранения ставят на 4-5 минут компресс из дезинфицирующего раствора или 70° этилового спирта;

2) при работе с возбудителем сибирской язвы место ранения тщательно промывают водой с мылом и смазывают йодом, без применения дезинфицирующих растворов;

3) при аварии с возбудителями глубоких микозов место ранения обрабатывают соответствующим дезинфицирующим раствором, моют водой с мылом, смазывают йодом;

4) при работе с вирусами I-II групп патогенности, кровь выдавливают в сухую стерильную салфетку и обрабатывают рану йодом без применения дезинфицирующего раствора;

5) при работе с ВИЧ после обработки раны и слизистых, пострадавшему не позднее 72 часов назначается профилактическая антиретровирусная терапия (АРВТ) и устанавливается наблюдение в течение 12 месяцев после несчастного случая. Пострадавший должен быть предупрежден, что он может послужить источником инфекции. В случае отрицательных анализов на ВИЧ через 6 недель, 12 недель, 6 месяцев и 1 год после несчастного случая наблюдение прекращают.

10. Если авария произошла при транспортировке материала (в автоклав-

ную и между подразделениями), персонал, оставив на местах переносимые емкости, покидает опасную зону и сообщает о случившемся руководителю подразделения. Лица, допустившие аварию, проходят санитарную обработку. Обработка помещения при аварии должна проводиться в противочумном костюме 1-типа.

11. Обо всех случаях лабораторного заражения микроорганизмами I-IV групп патогенности информация должна немедленно предоставляться в государственный уполномоченный орган в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Устройство микроскопа и правила работы с ним

Изучение клеток микроорганизмов, невидимых невооруженным глазом, возможно только при помощи микроскопов. Эти приборы позволяют получать изображение исследуемых объектов, увеличенное в сотни раз (световые микроскопы), в десятки и сотни тысяч раз (электронные микроскопы).

Биологический микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения.

Основными элементами современных световых микроскопов являются механическая и оптическая части (рис. 1).

К механической части относятся штатив, тубус, револьверная насадка, коробка микромеханизма, предметный столик, макрометрический и микрометрический винты.

Штатив состоит из двух частей: основания и тубусодержателя (колонки). **Основание** микроскопа прямоугольной формы имеет снизу четыре опорные площадки, что обеспечивает устойчивое положение микроскопа на поверхности рабочего стола. **Тубусодержатель** соединяется с основанием и может перемещаться в вертикальной плоскости при помощи макро- и микрометрического винтов. При вращении винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается от препарата. В верхней части тубусодержателя укреплена **головка** с гнездом для монокулярной (или бинокулярной) насадки и направляющей для револьверной насадки. Головка крепится **винтом**.

Тубус – это труба микроскопа, позволяющая поддерживать определенное расстояние между основными оптическими деталями – окуляром и объективом. Вверху в тубус вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус.

Револьверная насадка представляет собой вогнутый диск с несколькими гнездами, в которые ввинчиваются 3–4 объектива. Вращая револьверную насадку, можно быстро установить любой объектив в рабочее положение под отверстие тубуса.

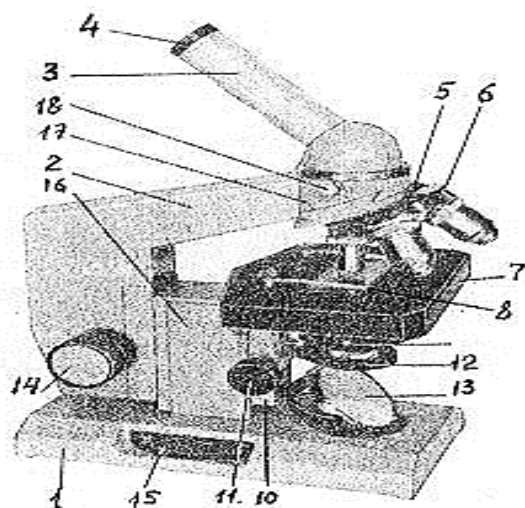


Рисунок 1 - Устройство микроскопа:

1 – основание; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус; 4 – окуляр; 5 – револьверная насадка; 6 – объектив; 7 – предметный столик; 8 – клеммы, прижимающие препарат; 9 – конденсор; 10 – кронштейн конденсора; 11 – рукоятка перемещения конденсора; 12 – откидная линза; 13 – зеркало; 14 – макровинт; 15 – микровинт; 16 – коробка с механизмом микрометрической фокусировки; 17 – головка для крепления тубуса и револьверной насадки; 18 – винт для крепления головки

Коробка микромеханизма несет с одной стороны направляющую для кронштейна конденсора, а с другой – направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа, представляющий собой систему зубчатых колес.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата или другого объекта исследования. Столик может быть квадратным или круглым, подвижным или неподвижным. Подвижный столик перемещается в горизонтальной плоскости при помощи двух боковых винтов, что позволяет рассматривать препарат в разных полях зрения. На неподвижном столике для обследования объекта в разных полях зрения препарат перемещают рукой. В центре предметного столика имеется отверстие для освещения снизу лучами света, направляемыми от осветителя. На столике имеются две пружинные клеммы, предназначенные для закрепления препарата.

Некоторые системы микроскопов снабжены препаратоводителем, необходимым при исследовании поверхности препарата или при подсчете клеток. Препаратоводитель позволяет производить передвижение препарата в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. На препаратоводителе имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта.

Макрометрический винт (макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта. При вращении макровинта по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при враще-

нии против часовой стрелки – поднимается.

Микрометрический винт (микровинт) используют для точной установки изображения объекта. Микрометрический винт является одной из наиболее легко повреждаемых частей микроскопа, поэтому с ним надо обращаться осторожно – не вращать с целью грубой установки изображения во избежание самопроизвольного опускания тубуса. При полном повороте микровинта тубус передвигается на 0,1 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из основных оптических деталей (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор)

Объективы (от лат. *objektum* – предмет) – наиболее важная, ценная и хрупкая часть микроскопа. Они представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу, на которой указаны степень увеличения и числовая апертура. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения, возникающих при рассмотрении исследуемого объекта.

Объективы бывают сухие и иммерсионные, или погружные. *Сухим* называется объектив, у которого между фронтальной линзой и рассматриваемым объектом находится воздух. Сухие объективы обычно имеют большое фокусное расстояние и увеличение 8х или 40х. *Иммерсионным* (погружным) называют объектив, у которого между фронтальной линзой и препаратом находится специальная жидкая среда. Вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей преломляется и не попадает в глаз наблюдателя. В результате этого изображение получается нечетким, более мелкие структуры остаются невидимыми. Избежать рассеивания светового потока можно путем заполнения пространства между препаратом и фронтальной линзой объектива веществом, показатель преломления которого близок к коэффициенту преломления стекла. К таким веществам относятся глицерин (1,47), кедровое (1,51), касторовое (1,49), льняное (1,49), гвоздичное (1,53), анисовое масло (1,55) и другие вещества. Иммерсионные объективы имеют на оправе обозначения: **I** (*immersion*) – иммерсия, **HI** (*homogen immersion*) – однородная иммерсия, **OI** (*oil immersion*) или **МИ** – масляная иммерсия. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще используют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

Объективы различают по их увеличению. Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8х, 40х, 60х, 90х). Кроме того, каждый объектив характеризуется определенной величиной рабочего расстояния. Для иммерсионного объектива это расстояние составляет 0,12 мм, для сухих объективов с увеличением 8х и 40х – 13,8 и 0,6 мм соответственно.

Окуляр (от лат. *okularis* – глазной) состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой (нижней), заключенных в металлическую оправу. Окуляр служит для увеличения изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра обозначено на его оправе. Существуют окуляры с рабочим увеличением от 4х до 15х.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться бинокулярной насадкой. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55–75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5х) и коррекционные линзы.

Конденсор (от лат. *condenso* – уплотняю, сгущаю) состоит из двух-трех короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. При помощи рукоятки, расположенной под предметным столиком, конденсор может перемещаться в вертикальной плоскости, что приводит к увеличению освещенности поля зрения при поднятом конденсоре и уменьшению его при опущенном конденсоре. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре имеется ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. При полностью открытой диафрагме рекомендуется рассматривать окрашенные препараты, при уменьшенном отверстии диафрагмы – неокрашенные. Под конденсором расположена **откидная линза** в оправе, используемая при работе с объективами малого увеличения, например, 8х или 9х.

Зеркало имеет две отражающие поверхности – плоскую и вогнутую. Оно закреплено на шарнирах в основании штатива и его можно легко поворачивать. При искусственном освещении рекомендуется пользоваться вогнутой стороной зеркала, при естественном – плоской.

Осветитель выполняет функцию искусственного источника света. Он состоит из низковольтной лампы накаливания, закрепляющейся на штативе, и понижающего трансформатора. На корпусе трансформатора имеется рукоятка реостата, регулирующего накал лампы и тумблер для включения осветителя.

Во многих современных микроскопах осветитель вмонтирован в основание.

Правила работы с микроскопом

1. Микроскоп берут одной рукой за колонку штатива, а другой поддерживают за основание. Брать и поднимать микроскоп за другие детали категорически запрещается.

2. На рабочем столе микроскоп помещают колонкой к себе. Перед началом работы следует осторожно удалить пыль с оптических частей микроскопа мягкой сухой тканью, не касаясь пальцами линз.

3. С помощью револьверной насадки устанавливают нужный объектив. Характерный щелчок фиксатора внутри револьвера свидетельствует о центрированном положении объектива. Необходимо помнить, что чем меньше увеличение объектива, тем больше фокусное расстояние. При работе с объективом 8х расстояние между препаратом и объективом около 9 мм, с объективом 40х оно составляет 0,6 мм, и с объективом 90х – около 0,15 мм.

4. На предметный столик помещают предметное стекло и закрепляют его клеммами.

5. Тубус микроскопа опускают вниз с помощью макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, и приближают к препарату (не касаясь его) на расстояние, меньше рабочего. Затем, глядя в окуляр, медленным вращением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого предмета.

6. Вращением микрометрического винта фокусируют объектив таким образом, чтобы изображение предмета было четким.

7. При работе с иммерсионным объективом на предметное стекло наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку на объектив, макрометрическим винтом осторожно опускают тубус так, чтобы фронтальная линза объектива погрузилась в масло. Затем, глядя в окуляр, медленным движением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока не появится изображение. Для точной фокусировки пользуются микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота.

Внимание! Запрещается искать изображение препарата с помощью микрометрического винта.

8. Препарат рассматривают в нескольких полях зрения, передвигая предметный столик при помощи боковых винтов, или перемещают его рукой на предметном столике. Находят наиболее подходящее поле зрения на участке препарата, на котором микроорганизмы видны отчетливо, в достаточном для просмотра количестве и зарисовывают микроскопическую картину.

9. При смене объективов следует регулировать интенсивность освещения рассматриваемого объекта. Желаемую степень освещения получают, опуская или поднимая конденсор.

10. По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат с предметного столика, удаляют масло с фронтальной линзы иммерсионного объектива фильтровальной бумагой, смоченной бензином, устанавливают при помощи револьверной насадки объектив в увеличении 8х, кладут на предметный столик кусочек чистой марли и опускают тубус.

Методы исследований, применяемые в микробиологической практике

При изучении микроорганизмов применяют следующие методы лабораторной диагностики:

Микроскопический – основан на изучении микробов в препаратах - отпечатках из патологического материала или препаратах – мазках из чистых культур, обработанных простыми или сложными методами окраски с использованием светового, люминесцентного или электронного микроскопов. При этом описывают морфологические и тинкториальные свойства.

Бактериологический (микробиологический) – метод основан на проведении посевов микробов на искусственные обычные или специальные питательные среды с целью выделения чистой культуры и изучения ее свойств.

Биологический (биопроба) – основан на выявлении и изучении патогенных и токсигенных свойств у выделенных микробов путем инфицирования (заражения) наиболее чувствительных лабораторных животных.

Серологический – основан на обнаружении иммунных тел (антител) в сыворотках крови больных животных с помощью стандартных известных бактериальных антигенов, а также на идентификации, т.е. определения вида выделенной чистой культуры (антигена) с помощью стандартных специфических иммунных сывороток (содержащих антитела).

Систематика микроорганизмов.

Микроорганизмы - это организмы, невидимые невооруженным глазом из-за их незначительных размеров. Этот критерий - единственный, который их объединяет. В остальном мир микроорганизмов еще более разнообразен, чем мир макроорганизмов.

Согласно современной систематике, микроорганизмы относятся к трем царствам:

Vira - к ним относятся вирусы;

Eucariotae - к ним относятся простейшие и грибы;

Procariotae - к ним относятся истинные бактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы, спирохеты, актиномицеты.

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

морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является нуклеоид, или генофор, представляющий собой замкнутую кольцевую двуниевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране; по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомной бактерией;

сетчатого аппарата Гольджи;

эндоплазматической сети;

митохондрий.

Имеется также ряд признаков или органелл, характерных для многих, но не для всех прокариот, которые позволяют отличать их от эукариотов:

многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, которые называются мезосомы, они связаны с нуклеоидом и участвуют в делении клетки, спорообразовании, и дыхании бактериальной клетки;

специфический компонент клеточной стенки - муреин, по химической структуре - это пептидогликан (диаминопиеминовая кислота);

плазмиды - автономно реплицирующиеся кольцевидные молекулы двуниевой ДНК с меньшей, чем хромосома бактерий молекулярной массой. Они находятся наряду с нуклеоидом в цитоплазме, хотя могут быть и интегрированы в него, и несут наследственную информацию, не являющуюся жизненно необходимой для микробной клетки, но обеспечивающую ей те или иные селективные преимущества в окружающей среде. Наиболее известны плазмиды:

(F-плазмиды), обеспечивающие конъюгационный перенос между бактериями;

(R-плазмиды) - плазмиды лекарственной устойчивости, обеспечивающие циркуляцию среди бактерий генов, детерминирующих устойчивость к используемым для лечения различных заболеваний химиотерапевтическим средствам.

Также как для растений и животных, для названия микроорганизмов применяется бинарная номенклатура, - то есть родовое и видовое название, но если видовую принадлежность исследователям определить не удастся и определена только принадлежность к роду, то употребляется термин "species". Чаще всего это имеет место при идентификации микроорганизмов имеющих нетрадиционные пищевые потребности или условия существования.

Название рода обычно или основано на морфологическом признаке соот-

ветствующего 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.).

Царство прокариот включает в себя отдел цианобактерий и отдел эубактерий, который, в свою очередь, подразделяется на порядки:

собственно бактерии (отделы *Gracilicutes*, *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Mendosicutes*);

актиномицетов;

спирохет;

риккетсий;

хламидий.

Бактерии - это прокариотические, преимущественно одноклеточные микроорганизмы, которые могут также образовывать ассоциации (группы) сходных клеток, характеризующиеся клеточными, но не организменными сходствами.

Порядки подразделяются на группы. Основными таксономическими критериями, позволяющими отнести штаммы бактерий к той или иной группе, являются:

морфология микробных клеток (кокки, палочки, извитые);

отношение к окраске по Граму - тинкториальные свойства (грамположительные и грамотрицательные);

тип биологического окисления - аэробы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы;

способность к спорообразованию.

Дальнейшая дифференциация групп на семейства, рода и виды, которые являются основной таксономической категорией, проводится на основании изучения биохимических свойств. Этот принцип положен в основу классификации бактерий, приведенной в специальных руководствах - определителях бактерий.

Вид является эволюционно сложившейся совокупностью особей, имеющих единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими признаками. Для патогенных бактерий определение "вид" дополняется способностью вызывать определенные нозологические формы заболеваний.

Существует внутривидовая дифференцировка бактерий на варианты:

по биологическим свойствам (биовары или биотипы);

по биохимической активности (ферментовары);

по антигенному строению (серовары или серотипы);

по чувствительности к бактериофагам (фаговары или фаготипы);
по устойчивости к антибиотикам (резистентовары).

В микробиологии широко применяют специальные термины - культура, штамм, клон.

Культура - это видимая глазом совокупность бактерий на питательных средах. Культуры могут быть чистыми (совокупность бактерий одного вида) и смешанными (совокупность бактерий двух или более видов).

Штамм - это совокупность бактерий 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.

Клон - это совокупность бактерий, являющихся потомством одной клетки.

Палочковидные бактерии

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек – 2...7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5...1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*).

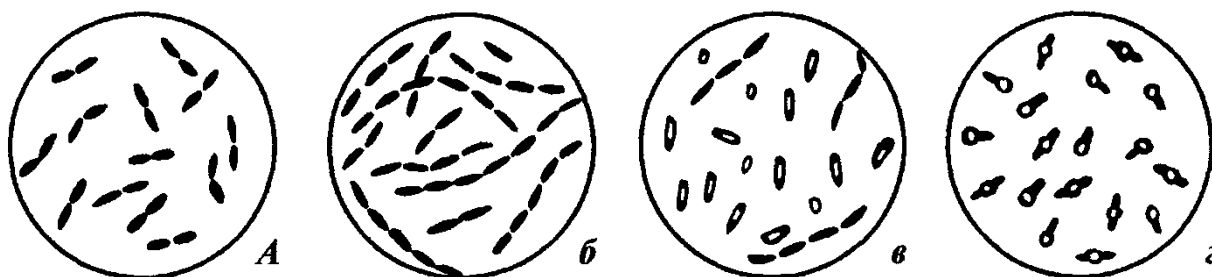
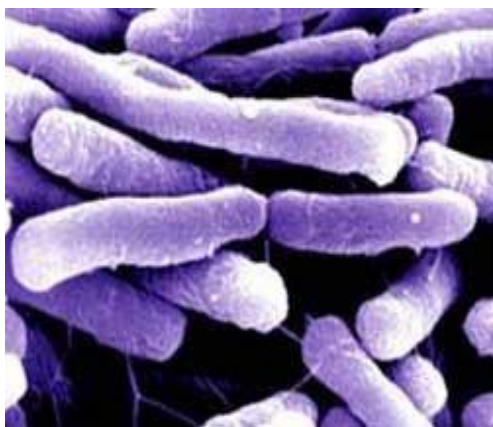


Рисунок 2 - Морфология палочковидных бактерий:

а - диплобактерии; *б* - стрептобактерии; *в* - бациллы; *г* – клостридии

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен.



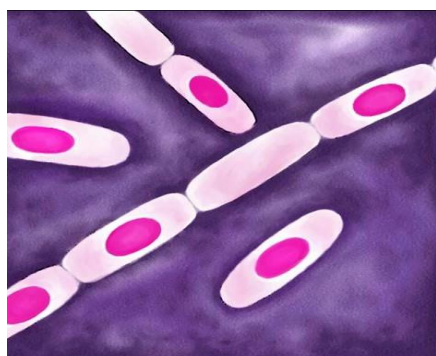
а



б

Рисунок 3 - Компьютерное изображение клеток *Escherichia coli* (а) и *Corynebacterium diphtheriae* (б)

Палочки, образующие споры называются *бациллами* и *кlostридиями*. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У кlostридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки).



а



б

Рисунок 4 – Компьютерное изображение бацилл (а) и кlostридий (б)

Палочковидные бактерии бывают подвижные и неподвижные; клетки подвижных форм палочковидных бактерий снабжены специальными приспособлениями для движения – *жгутиками*.

Шаровидные бактерии (кокки)

Кокками называют сферические или шаровидные бактерии. Различные виды бактерий этой группы различаются между собой:

- диаметром (диаметр шаровидных бактерий не превышает 1-2 мкм);
- взаимным расположением клеток.

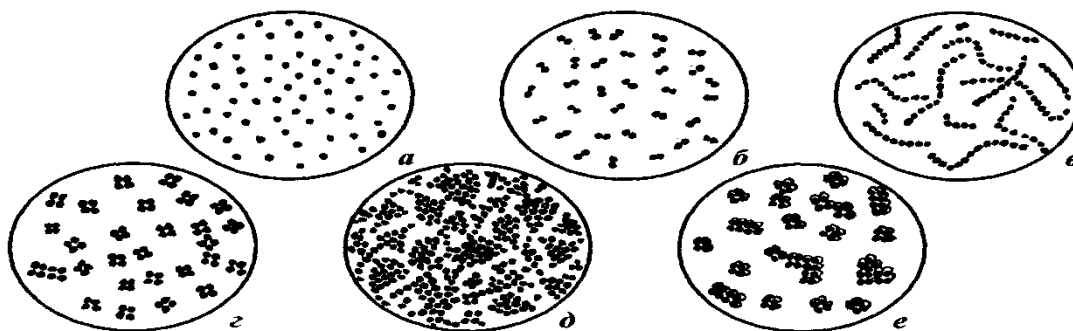


Рисунок 5 - Взаимные расположения кокков:
а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки;
д - стафилококки; е – сарцины

У разных видов бактерий закономерность расположения клеток после деления неодинакова. В зависимости от этого кокковые формы делятся на:

монококки или микрококки - клетки кокков располагаются поодиночке;

диплококки - кокки располагаются попарно, так как деление клетки происходит в одной плоскости;

стрептококки - кокки располагаются в виде цепочек, напоминающих нити бус, деление клеток происходит в одной плоскости, причем клетки после деления не отделяются друг от друга;

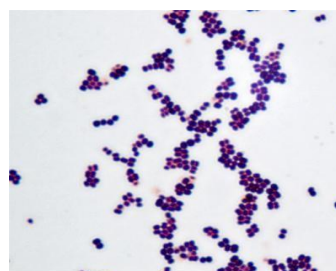
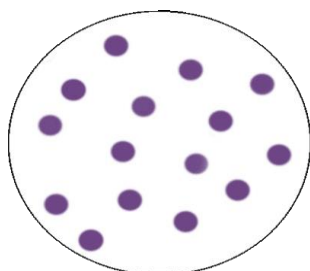


Рисунок 6 - Схематическое изображение микрококков и их расположение в мазке (окраска по Граму)

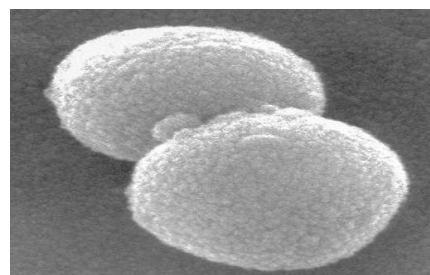
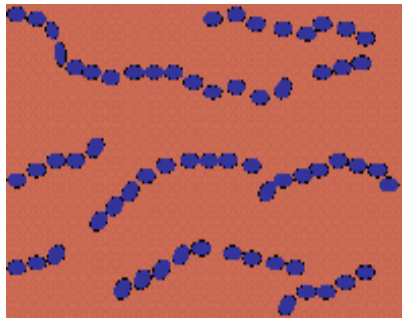
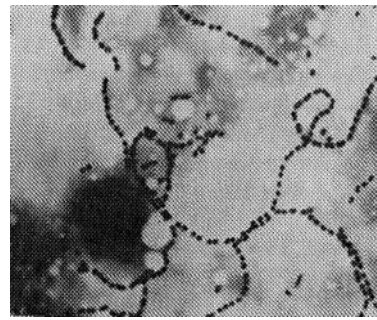


Рисунок 7 - Схема строения и электронная микрофотография *Streptococcus pneumoniae*



а



б

Рисунок 8 - Схематическое изображение стрептококка (а) и световая микроскопия препарата (б)

стафилококки - скопления кокков неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Деление этих кокков осуществляется в нескольких плоскостях;

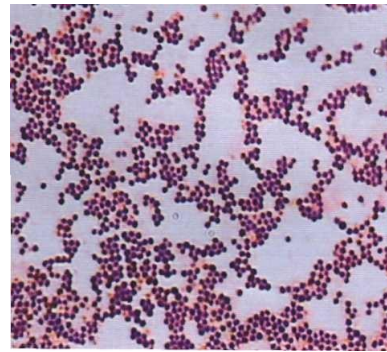
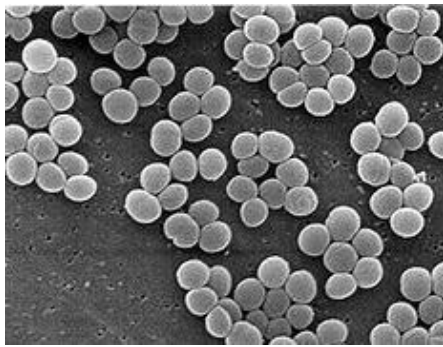


Рисунок 9 - Стафилококки. Электронная микрофотография и световая микроскопия (окраска по Граму)

тетракокки - образуют скопления из четырех клеток, что обусловлено делением клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

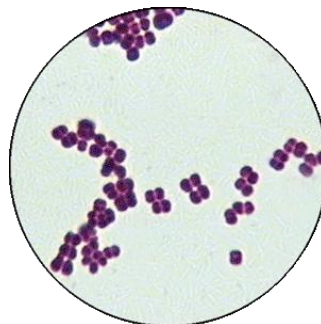


Рисунок 10 - Тетракокки, окраска по Граму

сарцины - имеют вид скоплений кубической формы в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

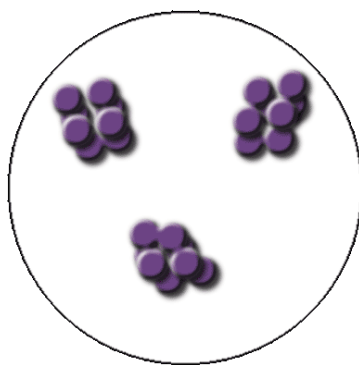


Рисунок 11 - Схематическое изображение сарцин

Все кокки неподвижны и не образуют спор.

Извитые бактерии

Извитые формы бактерий в зависимости от степени изогнутости подразделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты.

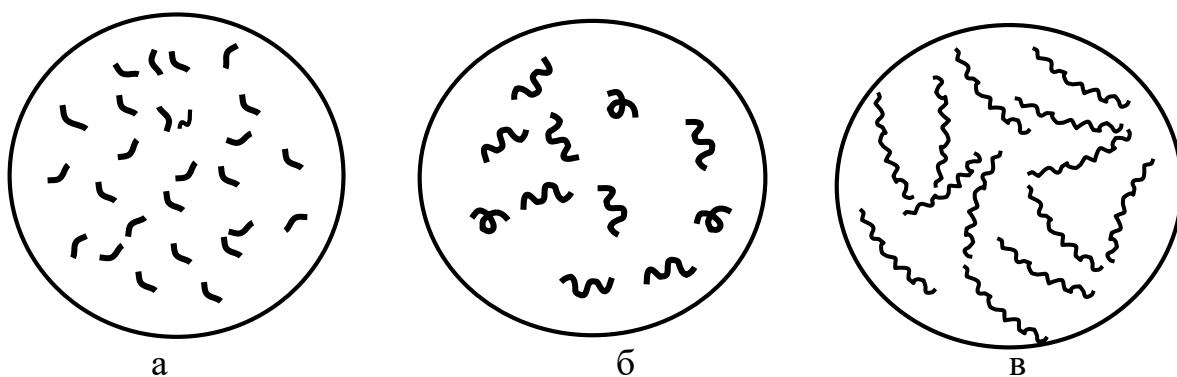


Рисунок 12 - Морфология извитых бактерий:
а - вибрионы; б - спириллы; в – спирохеты

Вибрионы - имеют вид запятой, самые мелкие из извитых форм. Длина клетки вибрионов не превышает 1-3 мкм.



Рисунок 13 - Холерный вибрион. Компьютерное изображение

Клетки *спирилл* длиной от 5 до 30 мкм имеют один или несколько завитков.

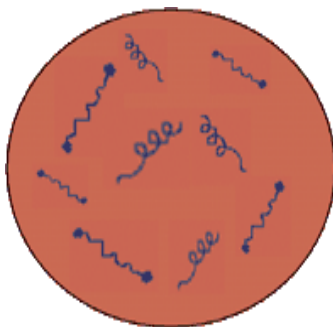


Рисунок 14 - Схематическое изображение спирилл

Характерная особенность *спирохет* - крайне малый диаметр клетки (0,1-0,6 мкм) при относительно большой (5-500 мкм) длине клетки. Клетки спирохет имеют вид штопора, покрыты эластичной оболочкой, позволяющей им винтообразно изгибать тело.

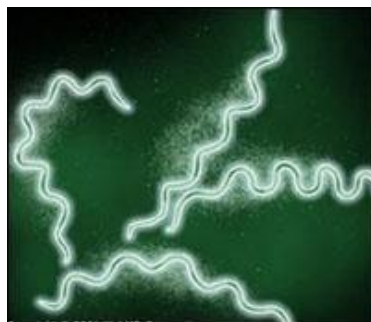


Рисунок 15 - Внешний вид спирохет, люминесцентная микроскопия

Все извитые формы подвижны. Движение осуществляется с помощью жгутиков (у вибрионов и спирилл) или за счет сокращения всей клетки (у спирохет).

Кроме этих наиболее распространенных в природе форм бактерий в почве и водоемах обнаружены новые формы бактерий: торроиды, простеки, нитчатые бактерии.

Торроиды имеют вид разомкнутого или замкнутого кольца.

Простеки имеют форму шестиугольной звезды, розетки, клетки с выростами.

Нитчатые бактерии - типичные водные организмы. Нити их имеют толщину в среднем 1 -7 мкм.



Рисунок 16 - Новые формы бактерий:
а – торроиды; б – простеки; в – нитчатые бактерии

Контрольные вопросы

1. Каковы основные правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Какие помещения включает микробиологическая лаборатория?
3. Назовите основные элементы механической части микроскопа.
4. Назовите основные элементы оптической части микроскопа.
5. Чем отличаются сухие объективы от иммерсионных?
6. Каково назначение макро- и микрометрического винтов?
7. Для чего нужна револьверная насадка?
8. Как определить увеличительную способность микроскопа?
9. Как регулировать степень освещенности препарата?
10. Перечислите методы исследований применяемы в микробиологической практике?
11. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как палочковидные?
12. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как шаровидные?
13. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как извитые?
14. Как осуществляется движение у бактерий?
15. Что такое «бациллы» и «кlostридии» и в чем их различия?
16. Какие новые формы бактерий Вам известны?
17. Какие взаимные расположения палочковидных бактерий Вам известны?
18. Какие извитые формы бактерий Вы знаете?

ТЕМА 2 МОРФОЛОГИЯ РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ, МИКОПЛАЗМ, ГРИБОВ

Цель работы: ознакомить студентов с основными формами микроорганизмов, изучить морфологические особенности микроскопических грибов.

Материалы и оборудование: плакаты, мазки из культур различных микроорганизмов, культуры бактерий на питательных средах, грибные культуры родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* на плотных средах в чашках Петри, суспензия дрожжей в бактериологических пробирках, красители для окраски бактерий, микроскопы, обезжиренные предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, препаровальные иглы, световые микроскопы.

Содержание и методика работы

Риккетсии

Риккетсии (*Rickettsia*) относятся к бактериоподобным микроорганизмам, так как они имеют ряд признаков, свойственных бактериям. Вместе с тем риккетсии обладают и некоторыми свойствами вирусов. Поэтому другие ученые отводят им промежуточное положение между бактериями и вирусами. Третьи — убеждены в том, что риккетсии составляют самостоятельную группу микроорганизмов и классифицируют их на роды, виды и типы.

Форма риккетсий кокковидная, палочковидная, нитевидная. При окраске по Романовскому—Гимза в них обнаруживают зерна. На основе изложенного П. Ф. Здродовский различает формы риккетсий: а) кокковидные однозернистые (до 0,5 мкм); б) палочковидные двузернистые (1 —1,5 мкм); в) бациллярные трех-четырёхзернистые (3—4 мкм) и д) нитевидные многозернистые (от 10 до 40 мкм). Все формы взаимнообратимы: а—>б—>в—>д—>а и т. д. В фазе активного и быстрого размножения многие риккетсии подвижны. Окрашиваются по Романовскому—Гимза в синий, по Цилю—Нильсену — в розовый, импрегнируются серебром по Морозову в коричнево-черный цвета. Структурно имеют наружную и внутреннюю стенки, цитоплазму, гранулы, вакуоли, нуклеоид.

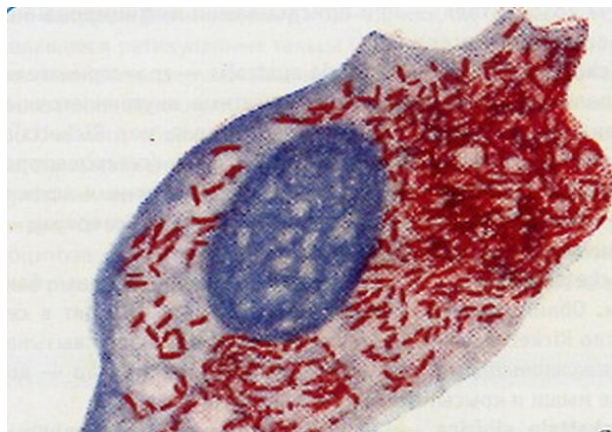


Рисунок 17 - Окраска риккетсий по Здродовскому

Размножаются риккетсии при помощи бинарного деления. Исследователи считают, что их размножение происходит за счет получения ими макроэнергических (богатых энергией) соединений от клеток организма хозяина. Последние данные ученых свидетельствуют о том, что риккетсии репродуцируются подобно крупным вирусам. Попав в животную клетку, они продельывают в ней семь стадий цикла развития, затем выходят наружу, внедряются в новые клетки и повторяют все сначала. На пятой стадии делятся, как бактерии, на мелкие кокковидные частицы.

Являются внутриклеточными паразитами. Культивируются в тканевых культурах, куриных эмбрионах; их поддерживают в легких зараженных мышей, в организме вшей, клещей, блох. Риккетсии волынской лихорадки и пароксизмального клещевого риккетсиоза выращивают и на бесклеточных искусственных средах; в организме могут расти и в межклеточных пространствах, тогда как остальные представители этого класса — только в ядрах или цитоплазме животных клеток.

Риккетсии вырабатывают ферменты и витамины, необходимые для самостоятельного биосинтеза белков и липидов, для извлечения энергии из углеводов. Находясь же в живой клетке, они используют часть готовых веществ на свои нужды.

Более сорока видов риккетсий непатогенны для человека и животных, обитают в членистоногих насекомых; свыше тридцати разновидностей обуславливают болезни млекопитающих.



Рисунок 18 - Морфология и строение риккетсий (по Здродовскому); а - кокковидные формы; б — палочковидные формы; в — бациллярные формы; г — нитевидные формы; д — дробление нитевидных форм

Хламидии

Хламидии, или гальпровии, относятся к облигатным внутриклеточным кокковидным грамотрицательным бактериям. Геном хламидий содержит в 4 раза меньше генетической информации, чем геном кишечной палочки. Хламидии размножаются только в живых клетках: их рассматривают как энергетических паразитов. По-видимому, у хламидий отсутствует система регенерации АТФ. Вне клеток хламидии имеют сферическую форму (0,3 мкм), являясь элементарными тельцами. Внутри клеток они превращаются в делящиеся ретикулярные тельца, образуются их скопления-включения. У человека хламидий вызывают трахому, орнитоз и др.

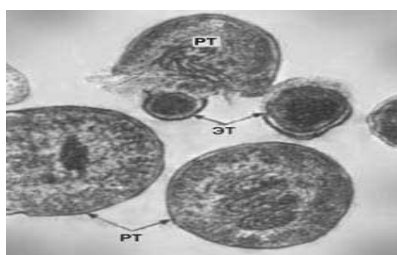


Рисунок 19 - Хламидии (ЭТ - элементарные тельца; РТ - ретикулятные тельца)

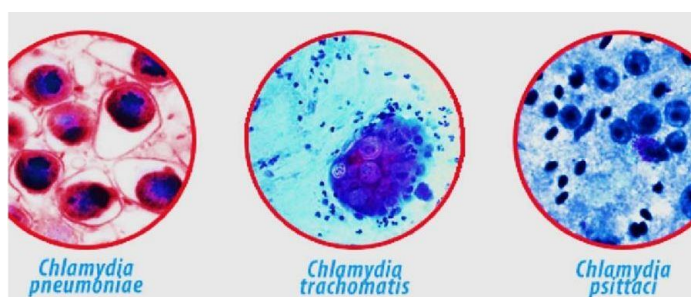


Рисунок 20 - Виды хламидий

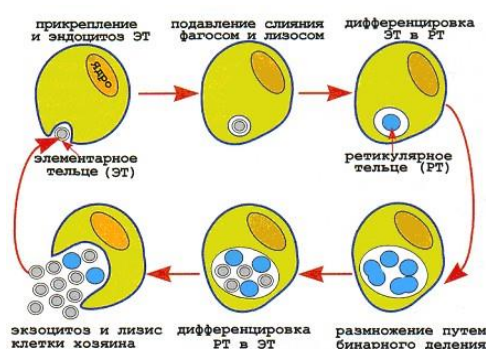


Рисунок 21 - Схема жизненного цикла хламидий

Микоплазмы

Микоплазмы (*Mycoplasma*)—мельчайшие микроорганизмы размером 100—150 нм, редко 200—700 нм, лишенные стенки и оформленного ядра, спор не образуют.

Из-за отсутствия наружной оболочки микоплазмы полиморфны, имеют зернистую, шаровидную, гроздевидную, нитевидную и кольцеобразную формы, проходят через многие бактериальные фильтры (рис. 9). Химический состав их близок к составу бактерий. Культивируются преимущественно в аэробных условиях, на средах, содержащих сыворотку животных. Первичные культуры нуждаются; также в добавлении к средам ДНК и РНК- Некоторые разлагают углеводы, другие нет. Дифференцируются по антигенной структуре.

Насчитывают 35 видов микоплазм. Широко распространены в природе. Имеются сапрофитные и патогенные для человека, животных и птиц виды. Вызываемая микоплазмами инфекция называется микоплазма-инфекция.

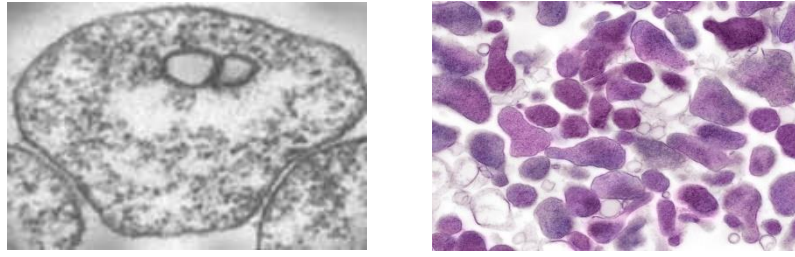


Рисунок 22 - Микоплазмы

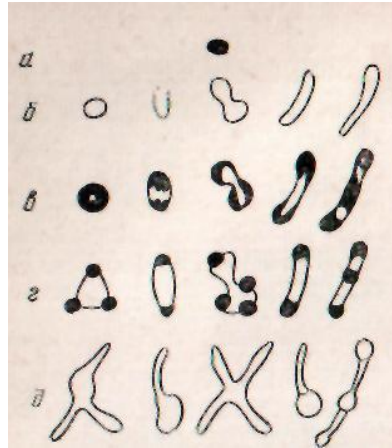


Рисунок 23 - Развитие микоплазм на жидкой питательной среде
(по Klicnberger — Nobel, 1962):
а — основной структурный элемент;
б, в, г, д — стадии образования разнообразных клеток

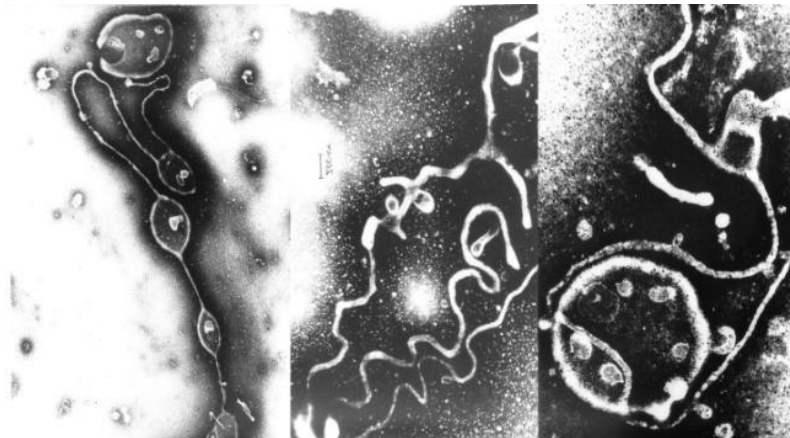


Рисунок 24 - Морфология микоплазм

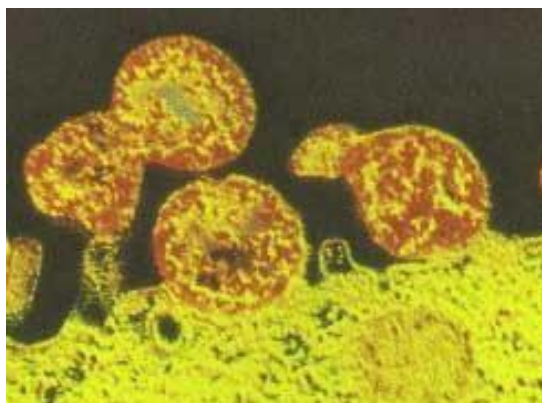


Рисунок 25 - Микоплазмы на мембране эукариотической клетки

Морфология грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *циноцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

Культуральные признаки микроскопических грибов

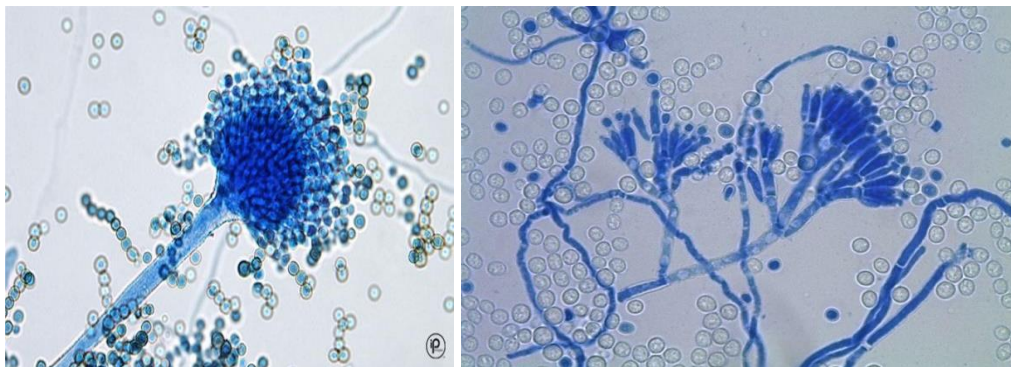
Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата,

бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов вырастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

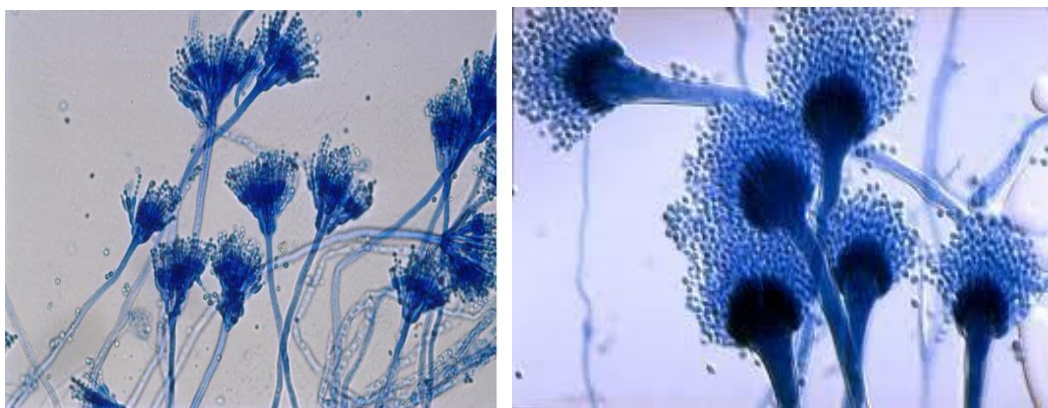
Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рис. 26.

Род *Mucor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют несептированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 26). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия мукоровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.



а

б



в

з

Рисунок 26 - Морфологические особенности грибов различных классов:
а - *Mucor*; б - *Penicillium*; в - *Aspergillus*; з - *Alternaria*

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы (рис. 26). Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит, что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

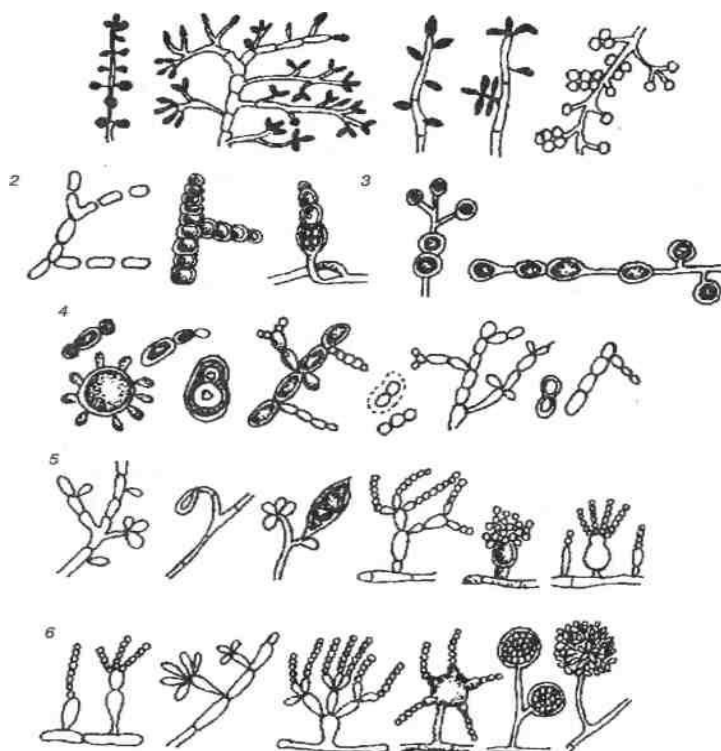


Рисунок 27 - Формы спорообразования у грибов:

- 1 – алейрии; 2 – артроспоры; 3 – хламидоспоры; 4 – бластоспоры;
5 – конидии разных типов; 6 – спорангиоспоры

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2...3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium*

chrysogenum используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «леечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилолитических ферментов.

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы (рис. 26). Гриб является возбудителем возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Морфология дрожжей и их характеристика

Дрожжи – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рис. 14.

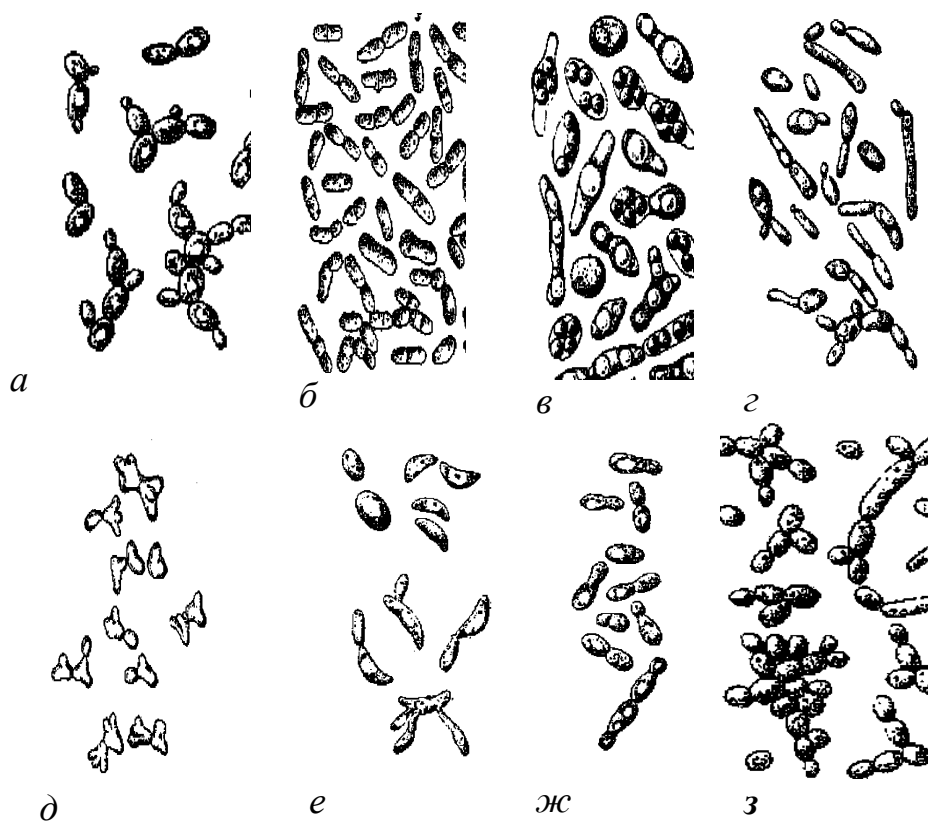


Рисунок 28 - Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в – апикулятная; лимоновидная; г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная; з, и - мицелиевидная

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое броже-

ние, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (таких как альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи - дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов. К дрожжам- вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные внешние признаки риккетсий.
2. Перечислите основные внешние признаки микоплазм и хламидий.
3. Дайте характеристику плесневых грибов.
4. Дайте характеристику несовершенных грибов.
5. Дайте характеристику лучистых грибов, дрожжей.

ТЕМА 3

СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель занятия: ознакомить студентов со строением бактериальной клетки.

Материалы и оборудование: плакаты, презентации.

Содержание и методика работы

Клетка прокариотических организмов имеет сложное строго упорядоченное строение и обладает принципиальными особенностями субмикроскопической организации и химического состава.

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные (рис.29). Основные структуры — это клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид.

Временные — капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспores, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерии; у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки).

Термин «оболочка» используют для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки; цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

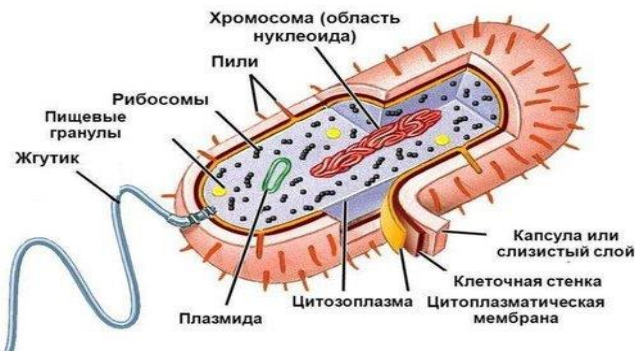


Рисунок 29 - Структура бактериальной клетки

Клеточная стенка. Важный структурный элемент бактериальной клетки, находится между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий — это внешняя оболочка клетки. Она имеется у всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме, а у многих видов патогенных бактерий токсична за счет поверхностных антигенов или несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. Клеточная стенка пронизана порами, через которые происходит транспорт экзотоксинов и других экзобелков бактерий. Толщина клеточной стенки 10... 100 нм; она содержит от 5 до 50 % сухого вещества клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *пептидогликан*, или *муреин* (от лат. *murus* — стенка), — опорный полимер сетчатой структуры, образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки.

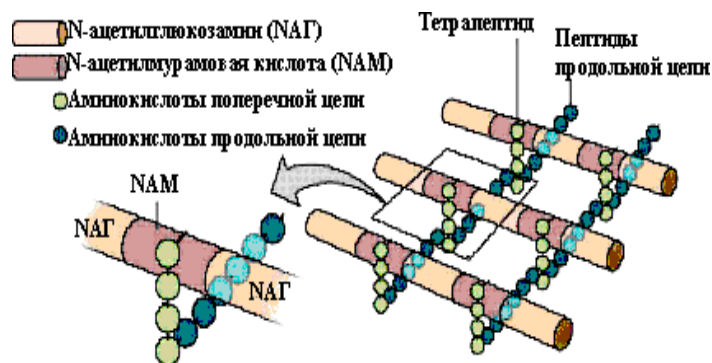


Рисунок 30 - Строение пептидогликана

Клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, массивна, ее толщина составляет 20...100нм. Для нее характерно наличие *тейхоевых кислот*, которые связаны с пептидогликаном и представляют собой полимеры трехатомного спирта — глицерина — или пятиатомного спирта — рибита, остатки которых соединены фосфодиэфирными связями. Тейхоевые кислоты связывают ионы магния и участвуют в транспортировке их в клетку. В составе клеточной стенки также присутствуют в небольших количествах полисахариды, белки и липиды.

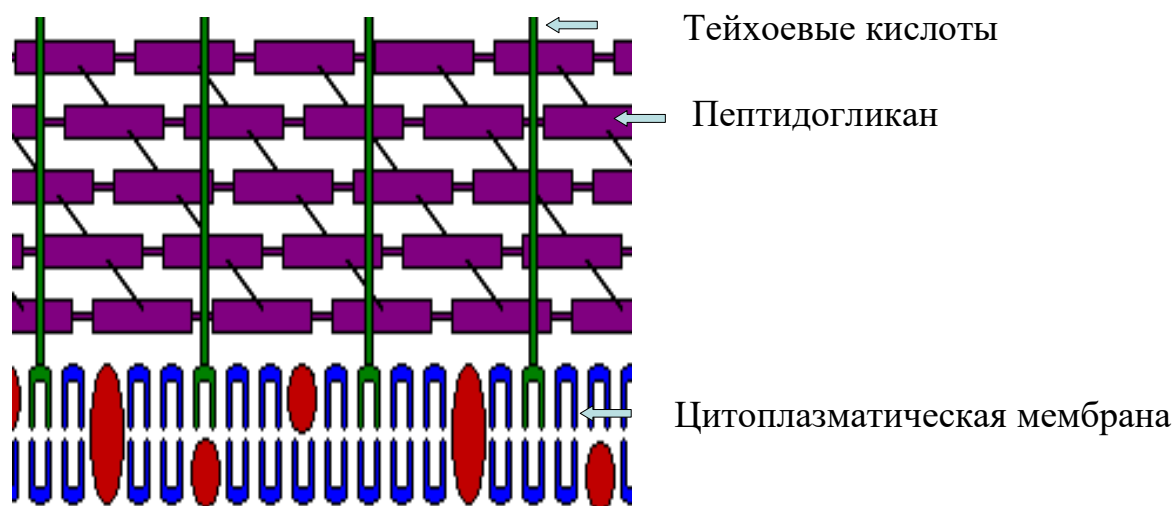


Рисунок 31 - Строение клеточной стенки грамположительных бактерий

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, ее толщина составляет 14... 17 нм. Внутренний слой — пептидогликан, образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку. Пептидогликан содержит только мезодиаминопимелиновую кислоту и не имеет лизина. Внешний слой клеточной стенки — наружная мембрана — состоит из фосфолипидов, липопротеина и белков.

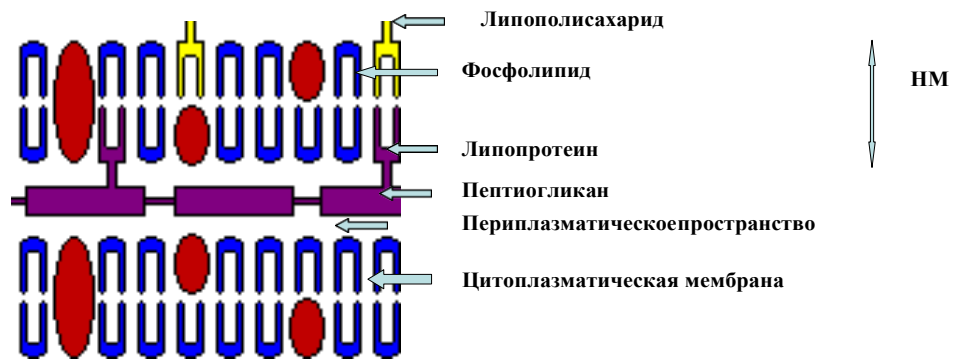


Рисунок 32 - Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Структурные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий ограничены от цитоплазматической мембраны и разделены промежутком, называемым периплазмой или периплазматическим пространством.

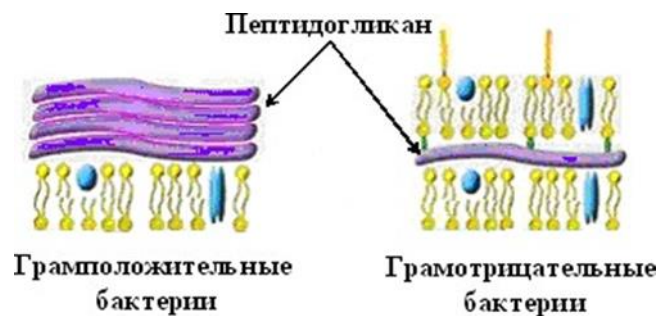


Рисунок 33 - Клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

Протопласты и сферопласты. Протопласты — это формы прокариот, полностью лишённые клеточной стенки, образуемые обычно грамположительными бактериями. Сферопласты — бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой с сохранением элементов наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных бактерий и значительно реже — у грамположительных. Образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана пенициллином в среде с соответствующим осмотическим давлением.

Протопласты и сферопласты имеют сферическую или полисферическую форму и в 3—10 раз крупнее исходных клеток. В обычных условиях в результате осмотического лизиса они погибают, а при повышенном осмотическом давлении способны некоторое время переживать, расти и даже делиться. Протопласты при снятии фактора, разрушающего пептидогликан, как правило, отмирают, но могут превращаться в L-формы; сферопласты легко реверсируют в исходные бактерии, иногда трансформируются в L-формы или же гибнут.

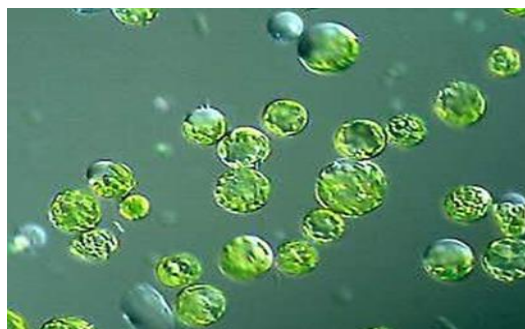


Рисунок 34 - Протопласты

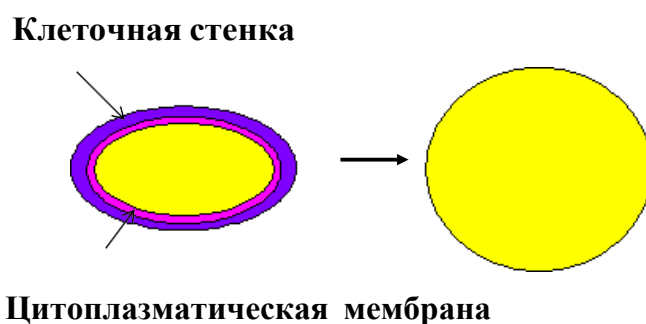


Рисунок 35 - Образование протопластов у бактерий.

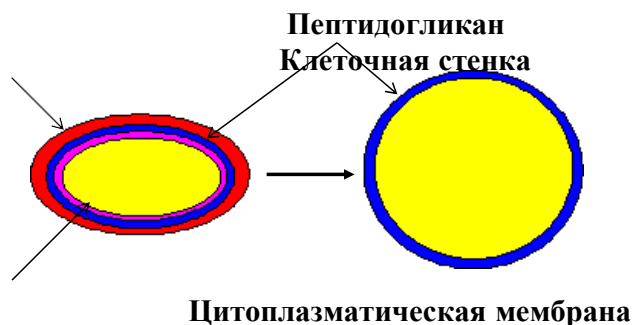


Рисунок 36 - Образование сфероластов у бактерий

L - формы бактерий — это фенотипические модификация, или мутанты, бактерии, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. Таким образом, L-формы — бактерии с дефектной клеточной стенкой. Образуются при воздействии L-трансформирующих агентов — антибиотиков (пенициллина, полимиксина, бацитрацина, стрептомицина), аминокислот (глицина, метионина, лейцина и др.), фермента лизоцима, ультрафиолетового и рентгеновского излучения. В отличие от протопластов и сфероластов L-формы обладают относительно высокой жизнеспособностью и выраженной способностью к репродукции. Клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран и миелоноподобные структуры. Вследствие дефекта клеточной стенки они ос-

мотически неустойчивы и их можно культивировать только на специальных средах с высоким осмотическим давлением; они проходят через бактериальные фильтры.

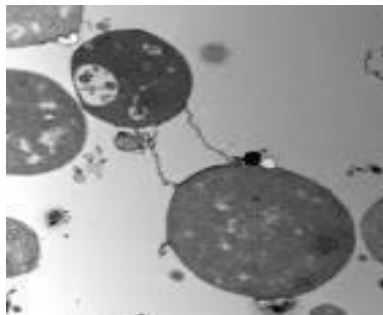


Рисунок 37 - L-формы бактерий

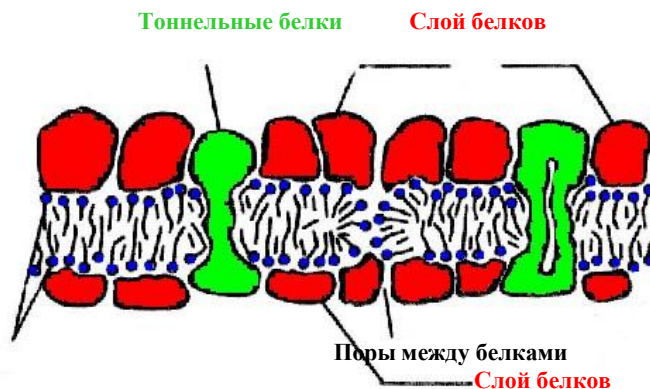
Различают стабильные и нестабильные L-формы бактерий. Стабильные полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами, и крайне редко реверсируют в исходные бактериальные формы. Нестабильные могут обладать элементами клеточной стенки, в чем они проявляют сходство со сферопластами, в отсутствие фактора, вызвавшего их образование, реверсируют в исходные клетки.

Процесс образования L-форм получил название L-трансформации, или L-индукции. Способностью к L-трансформации обладают практически все виды бактерий, в том числе и патогенные (возбудители бруцеллеза, туберкулеза, листерии и др.).

Цитоплазматическая мембрана и ее производные. Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) — полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8...15 % ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. На ультратонких срезах в электронном микроскопе выявлено ее трехслойное строение — два ограничивающих осмиофильных слоя толщиной 2...3 нм каждый и один ос-миофобный центральный слой толщиной 4...5 нм.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой белково-липидный комплекс, состоящий из 50...75 % белков и 15...20% липидов. Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера клетки, контролирует поступление питательных веществ и выход продуктов метаболизма наружу; ее субстратспецифические ферменты — пермеазы, осуществляют активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

Ферменты цитоплазматической мембраны катализируют конечные этапы синтеза мембранных липидов, компонентов клеточной стенки, капсулы и экзоферментов; на мембране локализованы ферменты окислительного фосфорилирования и ферменты транспорта электронов, ответственные за синтез энергии.



Бимолекулярный липидный слой

Рисунок 38 - Структура цитоплазматической мембраны

В процессе роста клетки цитоплазматическая мембрана образует многочисленные инвагинаты, формирующие внутрицитоплазматические мембранные структуры. Локальные инвагинаты мембраны получили название *мезосом*. Они хорошо выражены у грамположительных бактерий, хуже — у грамотрицательных и плохо — у риккетсий и микоплазм.

Установлена связь мезосом с хромосомой бактерии; такие структуры называются *нуклеоидосомами*. Мезосомы, как и цитоплазматическая мембрана, представляют собой центры дыхательной активности бактерий, поэтому их иногда называют аналогами митохондрий. Мезосомы увеличивают рабочую поверхность мембран, возможно, выполняют только структурную функцию, производя разделение бактериальной клетки на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов. У патогенных бактерий они обеспечивают транспортировку белковых молекул экзотоксинов.

Цитоплазма. Это содержимое бактериальной клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Состоит из *цитозоля* — гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты, РНК, вещества субстрата, ферменты, продукты метаболизма, и *структурных элементов* — рибосом, внутрицитоплазматических мембран, включений и нуклеоида.

Рибосомы — органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями.

В цитоплазме бактерий присутствуют (непостоянно) различного типа *включения*: твердые, жидкие и газообразные, с белковой мембраной или без нее. Значительная их часть представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживают гликоген и крахмалоподобное вещество гранулезу, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. К включениям, окруженным мембраной, также относятся газовые *вакуоли*, или *аэросомы*, которые встречаются у водных прокариот. Они снижают удельную массу клеток.

Нуклеоид. Ядро у прокариот состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1...1,6мкм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или *генофор*. Нуклеоид не отделен от остальной части клетки мембраной, т. е. у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки, (гистоны отсутствуют). Хромосома закрепляется на пилотплазматической мембране, а у грамположительных бактерий — на мезосоме. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивает рост цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро — дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. В нуклеоиде сосредоточен основной объем генетической информации бактериальной клетки.

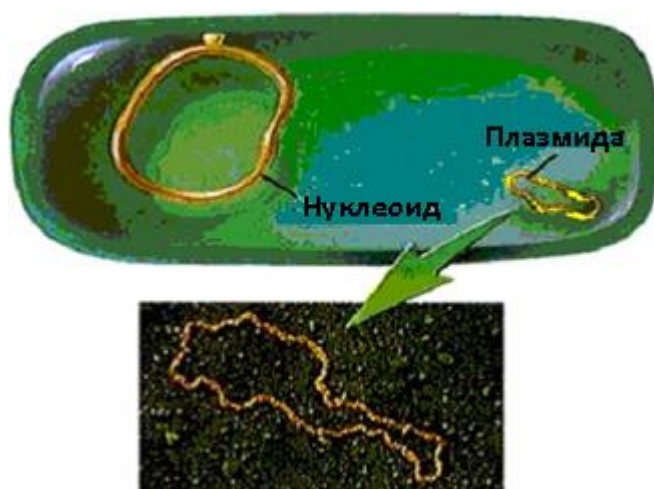


Рисунок 39 - Нуклеоид и плазмида в бактериальной клетке

Кроме нуклеоида в клетках многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы — *плазмиды*, представленные небольшими кольцевыми молекулами ДНК, способными к автономной репликации.

Капсула. Слизистый слой над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают видимую *макрокапсулу*, толщиной 0,2 мкм, в световом микроскопе, и *микрокапсулу*, толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при электронной микроскопии или выявляемую химическими и иммунологическими методами.

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.).

Капсула — полифункциональный органоид, выполняющий важную биологическую роль. Служит местом локализации капсульных антигенов, определяющих вирулентность, антигенную специфичность и иммуногенность бактерий. Утрата капсулы у патогенных бактерий резко снижает их вирулентность. Кап-

сулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм — от действия защитных сил макроорганизма: инкапсулированные клетки плохо фагоцитируются. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату.

Жгутики. Органы движения бактерий в виде тонких, длинных, нитевидных структур белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10...20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80...90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) — полный спиральный цилиндр диаметром 12...20 нм. Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. *Крюк* — изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным и жесткой нитью жгутика. *Базальное тельце* — сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не жизненно важные структуры бактериальной клетки: существуют фазовые вариации бактерий, когда в одной фазе развития клетки они имеются, в другой — отсутствуют.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий: *монотрихи* — бактерии с одним полярно расположенным жгутиком, *амфитрихи* — бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах; *лофотрихи* — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки; *перитрихи* — бактерии с множеством жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей ее поверхности (рис. 39). Бактерии, не имеющие жгутиков, называют *атрихиями*.

Будучи органами движения, жгутики типичны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное перемещение в жидкой среде и более медленное по поверхности твердых субстратов.

Бактерии передвигаются беспорядочно, однако они способны к направленным формам движения — таксисам, в зависимости от внешних стимулов. Реагируя на различные факторы окружающей среды, бактерии за короткое время локализуются в оптимальной зоне обитания. Таксис может быть положительным и отрицательным. *Хемотаксис* происходит в результате разницы в концентрации химических веществ в среде, *аэротаксис* — кислорода, *фототаксис* — интенсивности освещения, *магнитотаксис* обусловлен способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.

Пили (фимбрии, ворсинки) — прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3...25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Образованы специфическим белком — пилином; берут начало от цитоплазматической мембраны. Встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе. На поверхности клетки может быть от 1...2, 50...400 пилей до нескольких тысяч.

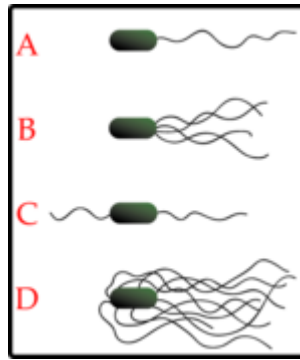


Рисунок 40 - Расположение жгутиков у бактерий: *A*- монотрихальное; *B* – лофотрихальное; *C* – амфитрихальное; *D* – перитрихальное



Рисунок 41 - Монотрих



Рисунок 42 – Лофотрих



Рисунок 43 - Амфитрих

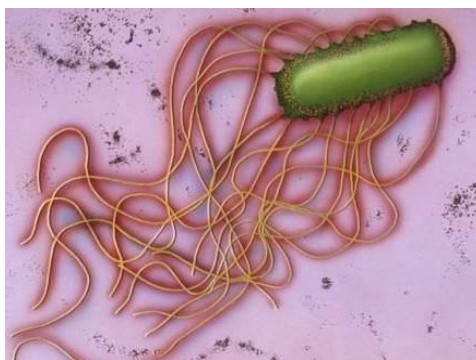


Рисунок 44 - Перитрих

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют *фимбриями*. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. *Половые* пили на поверхности бактерий в процессе конъюгации выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

Пили *общего типа* располагаются перитрихально (кишечная палочка) или на полюсах (псевдомонады); на одной бактерии их может быть сотни. Они принимают участие в слипании бактерий в агломераты, прикреплении микробов к различным субстратам, в том числе к клеткам (адгезивная функция), в транспорте метаболитов, а также способствуют образованию пленок на поверхности жидких сред; вызывают агглютинацию эритроцитов.

Споры (эндоспоры) бактерий — особое состояние покоящихся репродуктивных клеток, характеризующееся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется *эндоспорой*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

Основная функция спор — сохранение бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в среде катионов калия и марганца, изменении pH, повышении содержания кислорода и др.

В световом микроскопе споры видны в виде овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером 0,8...1,0—1,2...1,5 мкм; они могут располагаться *центрально* (*B. anthracis*), *субтерминально* — ближе к концу (*C. botulinum*), *терминально* — на конце палочек (*C. tetani*).

Расположение спор:

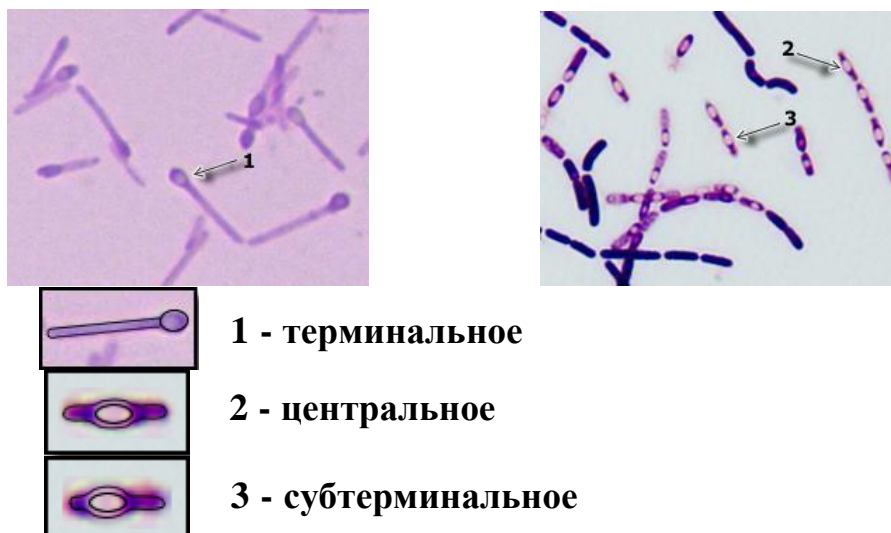


Рисунок 45 - Расположение спор в вегетативной клетке:

1 - бацилл, 2 - клостридий;

а - субтерминальное, б - терминальное, в - центральное

Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена *сердцевинной*, или *спороплазмой*, содержащей нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембраны структуры. Спороплазма окружена *цитоплазматической мембраной*, к которой прилегает зачаточный *пептидогликановый слой*, затем специфическим для спор массивным слоем *кортекса*, или *коры*. Кортекс состоит из мукопептидов, весьма сходных с мукопептидами клеточных стенок. В кортексе содержится также диаминопимелиновая кислота. Внутренняя плотная часть кортекса, прилегающая к мембране сердцевинки, при прорастании спор оформляется в клеточную стенку молодой вегетативной клетки. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора окружена *многослойной оболочкой*. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается *экзоспорум*.

Контрольные вопросы

1. Образование протопластов, сферопластов, L-форм.
2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
3. Мезосомы, типы, функции.
4. Транспортные и другие функции ЦПМ.
5. Органоиды прокариотной клетки.
6. Нуклеоид, плазмиды, эписомы.
7. Механизмы репликации бактериальной хромосомы.
8. Капсула, химизм, структура, функции.
9. Жгутики: строение, расположение, движение.
10. Типы движения у бактерий.
11. Фимбрии (пили): строение, типы, функции.
12. Эндоспоры, их биологический смысл, строение, типы, формирование, прорастание.

ТЕМА 4

МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомиться с условиями работы с чистыми культурами микроорганизмов, научиться готовить фиксированные и прижизненные препараты микроорганизмов, с красителями применяемыми в микробиологии и методами окрашивания микроорганизмов

Материалы и оборудование: набор красок, спирт ректификат 96,6%, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, предметные стекла, бактериологические петли, пинцеты, пробирки с микробными взвесями, кусочки органов и тканей, кровь, микроскопы, набор сухих бактериологических красок и их растворов, культуры бактерий на МПА и в МПБ, световые микроскопы, обезжиренные предметные стекла, фуксин Пфейффера, красящие бумажки по Синеву, раствор метиленовой сини, фильтровальная бумага, красители для окраски бактерий по методам Грамма и Циля-Нильсена, петли бактериологические, 96% этанол, плакаты.

Содержание и методика работы

Приготовление мазков.

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов. Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала.

1. *Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.).* Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

2. *Приготовление мазков из крови.* На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе - шлифованное - стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° и подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Тол-

щина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

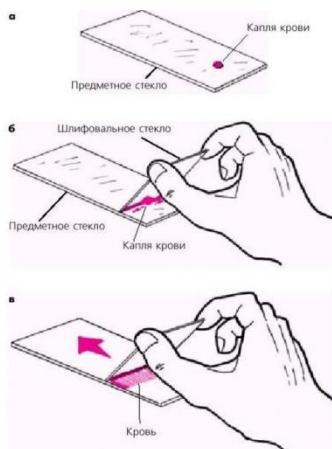


Рисунок 46 - Приготовление мазка из крови

3. *Приготовление толстой капли.* На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в “толстой капле” распределяется неравномерно, образуя неровный край.

4. *Приготовление мазка из вязкого материала (мокрота, гной).* Мокроту или гной, нанесенные на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

5. *Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред.* На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю физиологического раствора или дистиллированной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

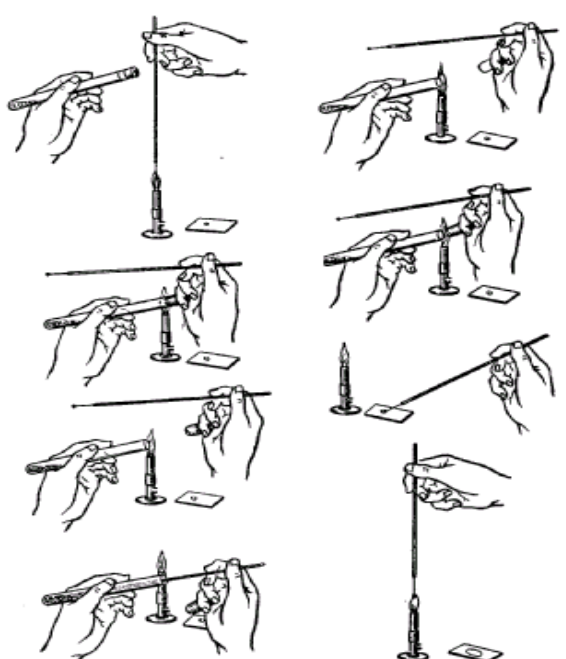


Рисунок 47 - Схема приготовления препарата-мазка

6. *Приготовление мазков из органов и тканей.* Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накаленными браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

7. *Препарат «раздавленная капля».* На чистое предметное стекло наносят из флакона каплю воды. В нее из пробирки вносят петлей небольшое количество исследуемой культуры, и осторожно перемешивают, не размазывая по стеклу. Культуру, выращенную в жидкой среде, наносят на предметное стекло пипеткой.

Суспензию микроорганизмов накрывают сверху покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха, мешающих исследованию. Избыток выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой, прикладывая ее к краям покровного стекла.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и препарат рассматривают с помощью иммерсионного объектива при опущенном конденсоре. Активно движущиеся бактерии проплывают через все поле зрения, меняют направления, совершают вращательные и круговые движения.

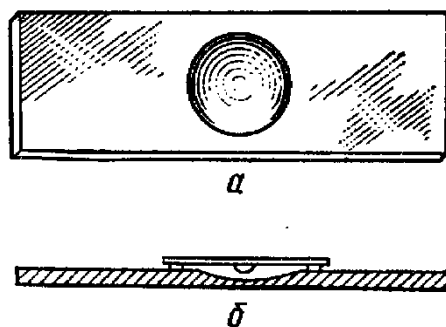


Рисунок 48 - Исследование микробов на подвижность
а - стекло с луночкой; б - «висячая капля»

8. *Препарат «висячая капля».* Для приготовления такого препарата требуются специальное предметное стекло с лункой посередине и обычное покровное стекло. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов (суспензию) наносят на середину покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и опускают ее на покровное стекло таким образом, чтобы находящаяся на нем капля суспензии приходилась на центр лунки.

Предметное стекло слегка прижимают к покровному, и стекла склеиваются. Препарат приподнимают и быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметическая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно подготовленном препарате капля должна свободно свисать с покровного стекла и не соприкасаться с дном или краями лунки.

На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают с объективом 90х в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и опущенном конденсоре).

Высушивание и фиксирование мазков. Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как: Безводный метиловый спирт. Этиловый (винный) спирт 96%. Жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотно-

шении 1:1). Жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

Техника окраски мазков. Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, что предложено А. И. Синевым. Простота приготовления, удобство применения, а также возможность хранения красящих бумаг в течение долгого времени явились основанием для широкого их использования при различных способах окраски.

Приготовление красителей

Наиболее часто в микробиологической практике используются следующие анилиновые краски: фуксин (основной), метиловый красный, нейтральный красный — в растворе имеют красный цвет; карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет, готовая жидкая краска Гимза (азур-эозин) фиолетового цвета; метиленовая синь, бриллиантовая и малахитовая зелень.

Из сухих кристаллических или порошкообразных красителей готовят водные или спиртовые растворы красок. Последние обычно готовят впрок, так как они хорошо сохраняются в темноте (посуда из темного стекла, темное помещение). Для усиления действия красящих растворов на микробную клетку используют различные протравители, которые добавляют в раствор красителя (фенол, едкий калий) или ими обрабатывают препарат перед окрашиванием (слабые растворы соляной, серной или хромовой кислот). Также с целью протравливания препарат с налитой на него краской прогревают или заливают предварительно подогретым раствором краски. Краски, нестойкие в растворе, не сохраняющиеся длительное время, готовят только непосредственно перед употреблением в виде 1-2% -ного раствора.

Спиртоводные растворы. *Карболовый фуксин (фуксин Циля).* Кристаллы основного фуксина предварительно растворяют в 96% -ном этиловом спирте. Сначала готовят насыщенный спиртовой раствор (на 5-10 г краски 100 мл спирта). Для лучшего и более быстрого растворения кристаллы краски предварительно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве спирта с добавлением нескольких капель глицерина. Чисто спиртовой раствор для окраски непригоден, поэтому готовят спирто-водный раствор: к 10-20 мл насыщенного спиртового раствора фуксина добавляют 100 мл дистиллированной воды с 5% фенола (протрава). Полученный раствор фуксина фильтруют через фильтровальную бумагу. В ряде случаев фуксин Циля перед использованием разбавляют еще раз дистиллированной водой (1:10) и получают его рабочий раствор (фуксин Пфейффера).

Карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет. Первые два красителя в растворе очень быстро выпадают в осадок и при окрашивании могут исказить микроскопическую картину. Чаще используют генцианвиолет, который получают смешением метил- и кристаллвиолета с добавлением декстрина; он дает более ровное окрашивание. Для приготовления спирто-водного раствора 1 г сухого генцианвиолета растворяют в 10 мл спирта, растирая в ступке

с глицерином и кристалликами фенола (2%), затем добавляют дистиллированную воду. Чтобы избежать образования осадка при хранении раствора, листы фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным спиртовым раствором краски, высушивают их на воздухе, нарезают мелкими полосками или квадратами и сохраняют в темной банке с притертой пробкой.

При окраске препарата на него накладывают высушенную полоску с генцианвиолетом, сверху наливают несколько капель воды, выдерживая 2-3 мин.

Раствор метиленовой сини (щелочная синь Леффлера). Для приготовления раствора 3 г краски настаивают длительное время (3-4 мес.) в 100 мл 96% -ного спирта, затем 30 мл насыщенного раствора разбавляют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 1 мл 1%-ного раствора едкого калия (протрава). Фильтруют.

Водные растворы. *2%-ный сафранин:* 2 г сухого красителя заливают 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр и сразу используют свежий раствор для окрашивания.

1%-ный раствор малахитовой зелени: 1 г кристаллической краски растворяют в 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют ее, остужают и используют для окрашивания.

Готовую жидкую краску азур-эозин (краска Гимза) применяют при специальных методах окрашивания бактериальных препаратов. Перед употреблением ее необходимо разбавить дистиллированной водой (1:10), но при этом сразу образуется осадок. Чтобы последний не влиял на препарат, окрашивание проводят, по рекомендации Романовского, следующим образом: на дно чашки Петри кладут стеклянные палочки или спички с обломанными головками, на них помещают препарат мазком вниз, раствор краски подливают под препарат (метод Романовского-Гимза).

Простой метод окраски. При данном методе используют только один краситель. На фиксированный препарат, помещенный на мостике над сливной чашкой, наливают раствор либо метиленовой сини (окрашивают 4-5 мин), либо карболовый фуксин Пфейффера (1-2 мин), либо карболовый генцианвиолет (1-2 мин). Краску смывают водой из бутылки, препарат высушивают фильтровальной бумагой и наносят каплю иммерсионного масла. Готовый препарат помещают на предметный столик и микроскопируют.

Сложные (дифференцирующие) методы окраски. Они отличаются от простых методов тем, что препарат окрашивают несколькими красками, а в отдельных случаях используют еще специальные реактивы (раствор Люголя, кислоты и др.). Сложные методы позволяют выявить наличие (или отсутствие) отдельных структурных элементов и некоторых органических соединений клетки, чем и определяют тинкториальные свойства каждого вида микроба.

Метод окраски по Граму. Фиксированный препарат окрашивают карболовым генцианвиолетом в течение 2-3 мин. Не смывая водой, краску сливают и на 2-3 мин на препарат наносят раствор Люголя (йода кристаллического — 1 г; йодистого калия как растворителя йода — 2 г; дистиллированной воды — 300 мл). Раствор Люголя сливают; препарат, не промывая водой, обрабатывают 96% -ным спиртом в течение 30 с, затем хорошо промывают водой. После этого

препарат дополнительно окрашивают рабочим раствором фуксина (до 1 мин), вновь промывают водой, сушат фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При окраске по Граму одни виды бактерий не обесцвечиваются спиртом после первичного окрашивания и сохраняют фиолетовый цвет; их называют *грамположительными*. Другие виды обесцвечиваются спиртом, а затем воспринимают дополнительную окраску фуксином и приобретают розово-красный цвет; их называют *грамотрицательными*. Окрашивание по Граму обусловлено структурными особенностями клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных групп микробов, длиной и формой ее пор, неодинаковым химическим составом и строением пептидогликанового слоя клеточной стенки микроорганизмов. Генцианвиолет (или кристаллвиолет) и нуклеиновые кислоты цитоплазмы в присутствии йода (раствор Люголя) образуют прочный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в спирте. Поэтому при действии спиртом в течение 30 с бактерии с многослойным пептидогликановым каркасом (грамположительные) не обесцвечиваются. У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой имеет более крупные поры, что облегчает прохождение спирта; образовавшийся комплекс разрушается, клетка обесцвечивается.

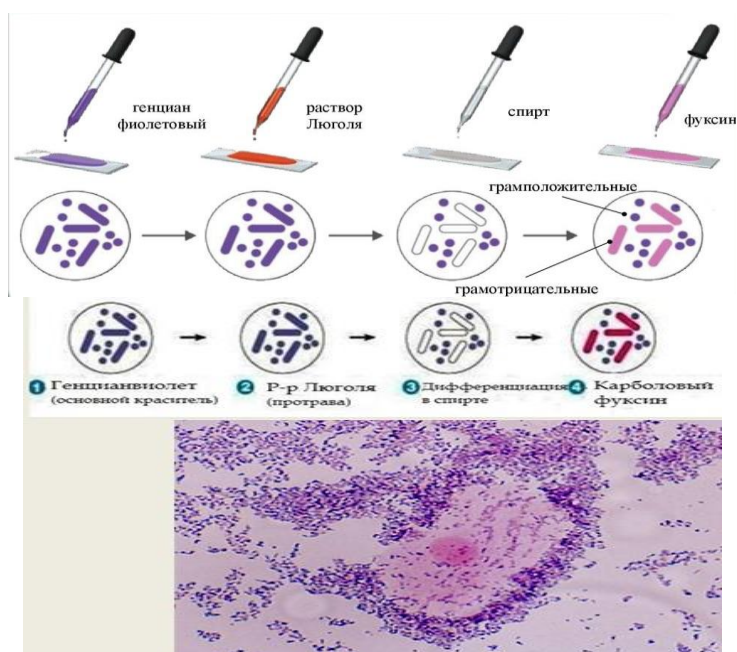


Рисунок 49 - Метод окраски по Граму

Методы окраски кислото-, спирто-, щелочеустойчивых бактерий. Микробы данной группы (микобактерии туберкулеза, паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота, проказы человека и др.) принадлежат к грамположительным бактериям. Для их дифференциации применяют специальные методы окрашивания, основанные на различной химической структуре цитоплазмы и клеточной оболочки. В состав этих бактерий входит значительное количество жирно-восковых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтионовой кислоты до 40%), поэтому они трудно воспринимают краски. Но если они

окрасились при воздействии протравителя, то трудно уже обесцвечиваются кислотами, спиртами и щелочами.

Наиболее распространенным методом окраски бактерий данной группы является *метод Циля-Нильсена*. На фиксированный препарат кладут кусок белой фильтровальной бумаги (для предохранения от осадка), на него наливают раствор карболового фуксина, снизу препарат подогревают над пламенем до появления паров и оставляют на «мостике» (5-7 мин). Затем краску с бумажкой сливают (не промывая) и обесцвечивают 3-5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовой синью Леффлера (4-5 мин). Далее препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Кислотоустойчивые (спирто-, щелочеустойчивые) бактерии окрашиваются в красный цвет (не обесцвечиваются кислотой), а некислотоустойчивые — в синий, так как легко окрасившись фуксином, они легко обесцвечиваются кислотой и воспринимают вторичную окраску синью.

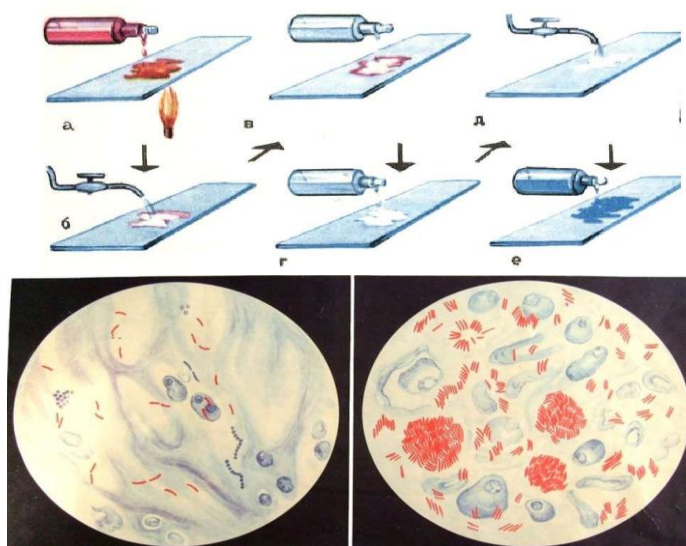


Рисунок 50 - Метод окраски Циля-Нильсена

Методы окраски непостоянных элементов микробной клетки. В структуре микробной клетки различают постоянные и непостоянные элементы. Постоянные — это цитоплазма, оболочка, ядерное вещество; непостоянные — спора, капсула, жгутики, которые при определенных условиях формируются лишь у бактерий отдельных видов, поэтому служат видовым признаком.

Окраска спор. Палочковидные микробы, образующие во внешней среде (почве, воде, кормах, на питательных средах) стойкую форму существования — спору, называют бациллами. При спорообразовании в клетке происходят процессы, обуславливающие сгущение цитоплазмы, уменьшение свободной воды (до 40%). Цитоплазматическое содержимое покрывается многослойными оболочками, химический состав которых обеспечивает высокую стойкость споры к нагреванию, высушиванию, действию многих кислот, щелочей, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки; при незаконченном процессе спора, в зависимости от вида

микроба, располагается либо в центре клетки, либо на конце (терминально), либо между концом и центром клетки (субтерминально). При микроскопировании препаратов, окрашенных простым методом или по Граму, видна окрашенная вегетативная часть клетки и неокрашенные, хорошо преломляющие свет споры.

Метод Ауески. Высушенный на воздухе препарат, не фиксируя, протравливают 0,5% -ной соляной кислотой с подогреванием (2-3 мин), охлаждают, промывают водой и фиксируют над пламенем. Затем на препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают на него карболовый фуксин Циля, окрашивают с подогреванием до паров (7-8 мин), краску сливают, препарат обрабатывают 5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают водой. Дополнительно окрашивают метиленовой синью (4-5 мин), опять промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют под иммерсией: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Ожешко. На нефиксированный мазок наливают 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1-2 мин. С препарата сливают кислоту, промывают его водой и после высыхания фиксируют на пламени. Фиксированный препарат красят по способу Циля - Нильсена. Тела бактерий окрашиваются в синий цвет, споры - в красный.

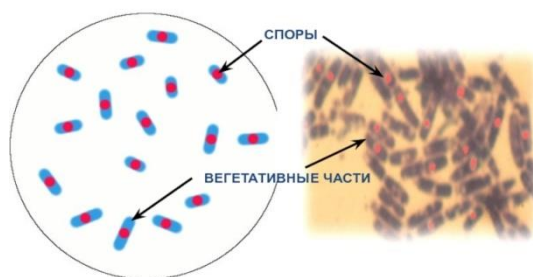


Рисунок 51 - Метод окраски по Ожешко

Метод Меллера. Фиксированный на пламени препарат протравливают 5% -ной хромовой кислотой (2-3 мин), промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой. Далее поступают, как в предыдущем методе. Результат окраски тот же: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Златогорова. Процесс окраски, как в предыдущих двух методах, только без протравы. После окрашивания вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Пешкова. Мазок фиксируют, красят метиленовой синью с подогреванием до кипения, смывают. Докрашивают 1%-ным водным раствором нейтральрота (10 с), смывают, просушивают. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в красный.

Метод Шеффера-Фултона. На фиксированный мазок наносят 5%-ный водный раствор малахитового зеленого и нагревают до появления паров. Мазок промывают водой и дополнительно прокрашивают 5 %-ным водным раствором сафранина 30-60 с. Краску смывают и просушивают фильтровальной бумагой. Микрокартина: споры – зеленые, вегетативные клетки – красные.

Окраска капсул. Капсула — производное наружного слоя оболочки. Представляет собой муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид. У патогенных капсулообразующих бактерий наличие капсулы наблюдают только в инфицированном организме как защитное приспособление против фагоцитоза (на искусственных питательных средах капсулы образуются лишь при добавлении кровяной сыворотки или дефибринированной крови). Капсулообразование отмечают у возбудителей сибирской язвы, злокачественного отека, диплококковой септицемии. Капсульное вещество плохо окрашивается, поэтому для его выявления применяют специальные методы окраски, основанные на явлении метакромазии.

Метод Михина. Фиксированный мазок из крови или препарат-отпечаток из ткани органа (печени, селезенки, почки) окрашивают метиленовой синью с подогреванием до появления паров (5-7 мин). Краску сливают, быстро промывают водой (можно не промывать), просушивают фильтровальной бумагой. Микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула — в светло-розовый.

Метод Романовского-Гимза. Фиксированный препарат окрашивают, как было указано выше: мазок-препарат помещают в чашку Петри на стеклянные или деревянные палочки отпечатком вниз, под препарат подливают краску, окрашивают 40-50 мин. Результат тот же, что и при окраске по Михину: микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула — в светло-розовый.

Метод Ольта. Свежий водный 2% -ный раствор сафранина наливают на препарат и выдерживают 5-7 мин. Затем слегка промывают водой и высушивают. Вегетативная клетка — кирпично-красного цвета, капсула — желто-оранжевого.

Метод окраски по Ребигеру Особенностью данного метода окраски является то, что препарат фиксируют не пламенем, а формалином, причем фиксация происходит одновременно с окраской. Для этой цели готовят следующий раствор: 15-20г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40% формалина, дают раствору постоять несколько часов. Затем этот насыщенный при комнатной температуре раствор фильтруют, после чего он готов к употреблению.

Проведение окрашивания. Предметное стекло перед исследованием обезжиривают и делают на нем мазки исследуемых культур. Мазки следует делать тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись на поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препарат высушивают при температуре 20-22 °С. На мазок наносят краситель Ребигера на 15-20 секунд. Затем быстро промывают водой и высушивают на воздухе. Микроскопируют с иммерсионной системой. Микроскопическая картина: капсулы бактерий окрашиваются в красновато-фиолетовый цвет, бактерии - в темно-фиолетовый.

Метод Муромцева. Фиксированный препарат окрашивают готовой краской Муромцева 20-30 с, промывают водой и высушивают. Капсулы окрашиваются в бледно-розовый цвет, микробная клетка - в темно-синий.

Метод Боголепова. Смешать на предметном стекле капсульную культуру с каплей колларгола (спиртовый раствор коллоидного серебра), приготовить тонкий мазок, высушить на воздухе. Микроскопическая картина: капсула неокрашена, фон светло – коричневый.

Метод Бурри-Гинса. Готовят препарат по Бурри: смешивают каплю взвеси микробов с каплей туши и при помощи стекла со шлифованным краем растирают смесь по предметному стеклу. Затем его высушивают и фиксируют. На мазок наносят водный раствор фуксина на 1-2 мин. Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. При этом бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черно-розовом фоне.

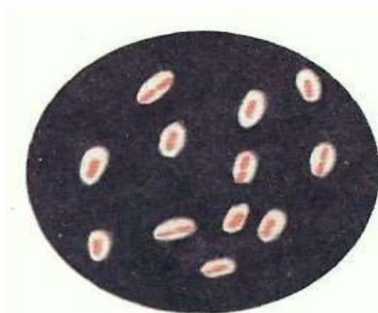


Рисунок 52 - Окраска капсул по Бурри-Гинса

Окраска жгутиков. Жгутики - органоиды движения некоторых видов бактерий. У разных бактерий они различаются по своей толщине (12-18 нм), длине (до 20 мкм) и амплитуде витка. Нити жгутика состоят из фибриллярного белка флагеллина. Аминокислотный состав флагеллина у разных видов микроорганизмов несколько различен. Строение жгутиков винтообразное: субъединицы располагаются по спирали вокруг свободного внутреннего пространства. У некоторых бактерий нить окружена чехлом. Расположение жгутиков и их число на поверхности клетки относительно постоянно. Для каждого вида бактерий это является диагностическим признаком. Жгутики характерны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Жгутики бактерий по характеру работы подобны корабельному винту. Жгутики вращаются сравнительно быстро.

Метод Леффлера На высушенный и зафиксированный мазок наливают протраву (1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 10 мл 20% водного раствора танина, 5,5 мл насыщенного на холоду водного раствора сульфата закислого аммиачного железа (соль Мора)) в таком количестве, чтобы покрыть всю поверхность покровного стекла и выдерживают 3 – 5 минут при комнатной температуре. По истечении указанного времени препарат осторожно и тщательно промывают проточной водой. На препарат наносят раствор фуксина (1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина на 10 частей воды) и препарат прогревают над пламенем до появления пара. Препарат промывают водой и микроскопируют.

Метод серебрения по Морозову (обнаружение жгутиков). Готовят 4 раствора. Раствор А: вода дистиллированная-100 мл, 40% раствор формалина-2 мл, ледяная уксусная кислота- 1 мл. Раствор Б: танин-5г, жидкая карболовая кислота-1 мл, вода дистиллированная –100мл. Раствор В: нитрат серебра-5г, дистиллированная вода –100мл. К 80 мл этого раствора по каплям добавляют аммиак до растворения

осадка. Для окраски раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

На препарат наносят раствор А на 1 минуту, затем раствор сливают, препарат промывают водой, обрабатывают раствором Б и подогревают 1 минуту до охлаждения паров, промывают водой, наносят раствор В и подогревают 1-2 минуты до появления темно-коричневой окраски мазка, промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: тела бактерий угольно-черного цвета, жгутики в виде тончайших волнообразно извитых нитей коричневого или янтарно-черного цвета на прозрачном или желтоватом фоне.

В повседневной бактериологической работе чаще используют косвенные методы обнаружения жгутиков – выявляют подвижность клеток исследуемой культуры в препарате «раздавленной капли» или «висячей капли»

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимо соблюдать при взятии культуры для мазка?
2. Какие препараты применяются в микробиологии для изучения морфологии микроорганизмов?
3. Каковы цели фиксации мазка?
4. Как готовят прижизненные препараты микроорганизмов?
5. Основные краски, предназначенные для окраски мазков.
6. Назначение и способы простого метода окрашивания.
7. Значение сложных методов окраски микробов при бактериологическом исследовании с использованием микроскопии.
8. Сущность, техника и практическое значение окраски по Грамму.
9. Методы окраски для выявления кислотоустойчивых бактерий и спор.
10. Значение и сущность окраски по Романовскому-Гимза.
11. Методы выявления капсул у капсулообразующих бацилл.
12. На чем основаны методы окраски капсул?
13. В чем суть окраски по Гинсу-Бурри?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Н.С. Величкович, О.В. Козлова, Е.Ю. Агаркова, Д.Н. Калугина. 2-е изд., перераб. и доп. Кемерово: КемГУ, 2023. 199 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/409484>
2. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие для вузов / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2021. 496 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/171851>
3. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: практикум. СПб.: Лань, 2012. 368 с.
4. Петрищева Т.Ю. Практикум по общей микробиологии [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Елец: ЕГУ им. И.А. Бунина, 2022. 89 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/331916>
5. Ромейко Л.В. Общая микробиология и микробиология: лабораторный практикум [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2022. 173 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/314003>
6. Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Общая микробиология и общая санитарная микробиология [Электронный ресурс]. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2023. 224 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/346448>
7. Шапиро Я.С. Микробиология [Электронный ресурс]. 6-е изд., стер. СПб.: Лань, 2024. 308 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/386048>

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна
Андрюшина Надежда Сигизмундовна

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий
по дисциплине «Микробиология» со студентами,
обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния»

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 09.12.2024 г. Формат 60x84. 1/16.
Бумага офсетная. Усл. п. 3,25. Тираж 25 экз. Изд. № 7775.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365, Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ