

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Бийский технологический институт (филиал)
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»

Е.П. Каменская

**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И ЦИТОЛОГИИ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ
по курсам «Основы микробиологии», «Микробиология»,
«Общая биология и микробиология» для студентов
направлений подготовки 240700.62, 260100.62, 100800.62
всех форм обучения

Бийск
Издательство Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова
2013

УДК 579.23(076)

К18

Рецензент: Н.К. Гайнанова, д. б. н., профессор кафедры биологии
АГАО им. В.М. Шукшина

Каменская, Е.П.

К18 Изучение морфологии и цитологии микроорганизмов: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по курсам «Основы микробиологии», «Микробиология», «Общая биология и микробиология» для студентов направлений подготовки 240700.62, 260100.62, 100800.62 всех форм обучения / Е.П. Каменская; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013.– 48 с.

В настоящих методических рекомендациях рассматриваются морфологические признаки бактерий и основных представителей микелиальных грибов. Описываются методы приготовления препаратов живых и фиксированных клеток микроорганизмов. Приводятся методики выявления клеточных структур и запасных веществ микроорганизмов.

УДК 579.23(076)

Рассмотрены и одобрены на заседании
кафедры «Биотехнология»
Протокол № 4 от 30.01.2013 г.

© Каменская Е.П., 2013

© БТИ АлтГТУ, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Морфологические признаки бактерий.....	5
2 Морфология мицелиальных грибов.....	9
3 Морфология дрожжей и их характеристика.....	16
4 Изучение микроорганизмов с помощью световой микроскопии.....	20
4.1 Подготовка стекол.....	20
4.2 Правила работы с бактериологической петлей.....	21
4.3 Отбор клеток микроорганизмов.....	21
4.4 Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов.....	23
4.5 Приготовление препаратов фиксированных клеток.....	25
4.6 Определение размеров клеток микроорганизмов.....	28
4.7 Выявление клеточных структур и запасных веществ.....	31
4.8 Эндоспоры.....	40
5 Лабораторная работа № 1 «Методы приготовления препаратов микроорганизмов».....	42
6 Лабораторная работа № 2 «Выявление клеточных структур и запасных веществ микроорганизмов.....	43
7 Рецепты красителей и индикаторов.....	44
Литература.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Определение систематической принадлежности микроорганизмов – сложная задача, требующая длительных наблюдений, значительного количества специфических исследований и биохимических анализов.

При идентификации микроорганизмов учитывают:

– *морфолого-цитологические признаки*. К ним относятся: строение, форма и размеры клеток, их взаимное расположение, тинкториальные свойства (особенности при окрашивании различными красителями), способность к образованию спор и капсул, подвижность, наличие жгутиков, образование в клетках некоторых включений, особенности размножения;

– *физиолого-биохимические признаки*. При изучении физиолого-биохимических признаков устанавливают отношение микроорганизмов к различным источникам углерода и азота, потребность в кислороде, температурные границы роста, солеустойчивость, чувствительность к антибиотикам, ферментативные тесты;

– *культуральные признаки*. К таким признакам относятся особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

При идентификации бактерий рекомендуется также учитывать дополнительные признаки: серологические свойства, фагоустойчивость, химический состав клеточных стенок, содержание отдельных нуклеотидов в нуклеоиде (единственной хромосоме бактерий – молекуле ДНК, состоящей из двух спирально закрученных цепочек нуклеотидов, замкнутых в кольцо).

Чем больше у различных микроорганизмов общих признаков, тем ближе они находятся друг к другу по степени родства.

Основными признаками, позволяющими распределить микроорганизмы на группы, являются морфологические признаки, которые легко и достаточно быстро можно определить с помощью микроскопа.

1 МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ БАКТЕРИЙ

Бактерии составляют наиболее обширную и весьма разнообразную группу микроорганизмов. Бактерии в основном представлены одноклеточными организмами, размножающимися простым поперечным делением клетки. Морфологически бактерии различают: по форме, величине, взаимному расположению клеток, наличию или отсутствию жгутиков и капсул, способности клеток к спорообразованию и так далее. По форме бактерии делят на три основные группы: шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии – кокки (от греч. *coccus* – зерно, шарик), по форме напоминают шар, но бывают овальные, плоские, одностронне вогнутые или слегка вытянутые. Шаровидные формы образуются в результате деления клеток в одной, двух, трех взаимно перпендикулярных или разных плоскостях. Диаметр кокков от 0,5 до 1,2 мкм. **Моно-** или **микрোকки** делятся в любой плоскости и сразу после деления обособляются, располагаясь одиночно. **Диплококки** и **стрептококки** образуются при делении клеток в одной плоскости. Соответственно, располагаются парами или цепочками. **Тетракокки** возникают при делении клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют группы по четыре особи, клетки располагаются попарно. **Сарцины** формируются при делении клеток в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, при этом образуются кубы из 8–16 клеток. Типичным примером сарцин является – *Sarcina flava* (сарцина желтая) – представитель микрофлоры воздуха. **Стафилококки** представлены скоплениями клеток, напоминающими виноградные грозди. Деление клеток происходит в любой плоскости.

Помимо правильной шаровидной формы, клетки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (**пневмококки**) или бобовидную форму кофейного зерна (**гонококки, менингококки**). Шаровидные бактерии, как правило, не имеют жгутиков, неподвижны и спор не образуют. Исключение составляет мочевая сарцина (*Sporosarcina ureae*).

Палочковидные бактерии – самая многочисленная и разнообразная группа микроорганизмов. Они имеют цилиндрическую форму тела с округлыми или заостренными концами и в сильной степени различаются по отношению длины к ширине. В среде палочковидные бактерии располагаются одиночно либо образуют короткие или длинные цепочки. Палочковидные бактерии различают по величине клеток, их расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клетки палочковидных бактерий колеблется от десятых долей микрометра до 10–15 мкм и более, диаметр клетки

от 0,5 до 1,0 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры (состава среды, значения рН, аэрации, температуры) и возраста культуры. Среди палочковидных бактерий встречаются как сапрофиты, так и патогенные формы.

Палочковидные формы принято делить на бациллы и бактерии. Большинство палочковидных микроорганизмов – формы, не образующие спор, получили название **бактерий**. Палочковидные бактерии, способные при неблагоприятных условиях формировать споры, принято называть **бациллами**. У бактерий выделяют три типа спорообразования:

- **бациллярный** – форма клетки перед спорообразованием не меняется. Спора локализуется в центре клетки, эксцентралью или терминально, что зависит от вида микроорганизма;

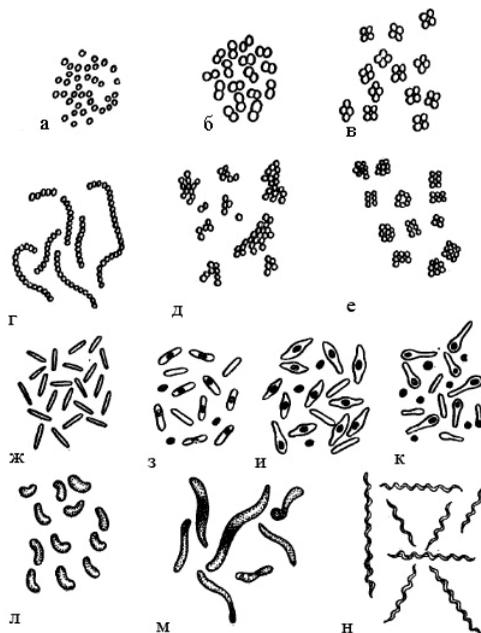
- **кlostридиальный** – середина клетки перед спорообразованием расширяется, и клетка приобретает вид челнока или веретена. Спора располагается в центре клетки или эксцентралью;

- **плектридиальный** – клетка перед спорообразованием расширяется на одном конце и приобретает вид барабанной палочки. Спора располагается в расширенном конце.

При микроскопии можно легко определить спорообразующие и неспорообразующие 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.

Палочки, как и кокки, могут располагаться попарно или цепочкой. При соединении бактерий попарно образуются **диплобактерии**, при таком же соединении бацилл – **диплобациллы**. Соответственно образуются **стрептобактерии** и **стрептобациллы**, если клетки располагаются цепочкой.

Извитые формы микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков. **Вибрионы** представляют собой короткие палочки в форме запятой или полумесяца. Клетки вибрионов изогнуты на $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{4}$ оборота. Длина клетки составляет от 1 до 3 мкм. **Спириллы** – извитые формы, образующие до 3–5 завитков. Размеры клетки по сравнению с вибрионами значительно крупнее – от 15 до 20 мкм. **Спирохеты** – тонкие длинные извитые формы со множеством завитков (в среднем от 6 до 15). Длина клетки превосходит ширину в 5–200 раз. Число витков спирали является одним из систематических признаков при определении вида. На рисунке 1 представлены описанные выше морфологические разновидности бактерий.



а – микрококки; б – диплококки; в – тетракокки;
 г – стрептококки; д – стафилококки; е – сарцины;
 ж – палочковидные, не образующие спор бактерии;
 з–к – палочковидные спорообразующие бактерии бациллярного (з),
 клостридиального (и), плектридиального (к) типов спорообразования;
 л – вибрионы; м – спириллы; н – спирохеты

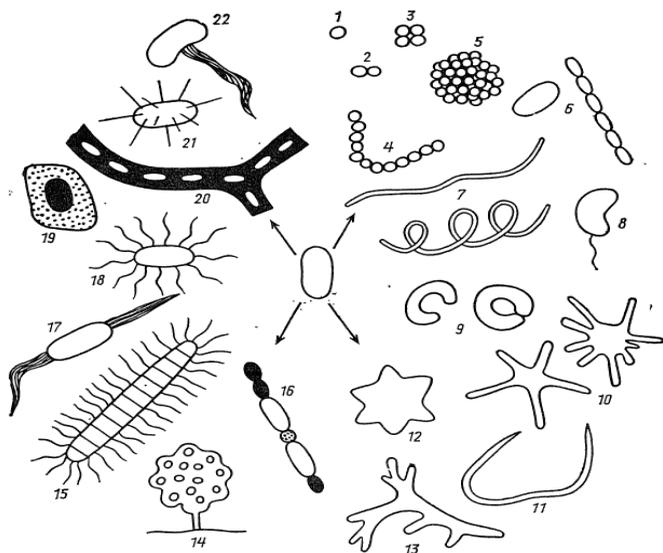
Рисунок 1 – Морфологические разновидности бактерий

В природе, помимо вышеописанных форм бактерий, встречаются и другие весьма разнообразные формы микроорганизмов. Они занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими. **Микобактерии** – палочки с боковыми выростами (возбудители туберкулеза). **Коринебактерии** напоминают микобактерии, но отличаются от них образующимися на концах утолщениями и включениями зерен в цитоплазме. **Нитчатые бактерии** – многоклеточные организмы, имеющие форму нити. **Миксобактерии** – скользкие микробы, по форме напоминающие палочки с заостренными или округлыми концами, у некоторых представителей этой группы бактерий есть ядра.

Своеобразную форму клетки имеют стебельковые и почкующиеся бактерии, несущие выросты, получившие название простек.

Простекобактерии могут быть треугольной или иной формы. Одна клетка может иметь от одной до восьми простек разной длины. Очевидно, простеки, увеличивая поверхность соприкосновения клетки с субстратом, способствуют проникновению питательных веществ.

Некоторые бактерии имеют вид кольца, замкнутого или разомкнутого, в зависимости от стадии роста, – **тороиды**. Из природных субстратов выделены бактерии **червеобразной формы** и напоминающие **шестиугольную звезду**. Все многообразие форм прокариот представлено на рисунке 2.



- 1 – кокк; 2 – диплококк; 3 – тетракокк; 4 – стрептококк; 5 – колония сферической формы; 6 – палочковидные бактерии; 7 – спириллы; 8 – вибрион; 9 – бактерии, имеющие форму замкнутого или незамкнутого кольца; 10 – бактерии, образующие выросты; 11 – бактерия червеобразной формы; 12 – бактериальная клетка в форме шестиугольной звезды; 13 – представитель актиномицетов; 14 – плодовое тело миксобактерии; 15 – нитчатая бактерия рода *Caryophanon* с латерально расположенными жгутиками; 16 – нитчатая цианобактерия, образующая споры; 8, 15, 17, 18 – бактерии с разными типами жгутикования; 19 – бактерии, образующие капсулу; 20 – нитчатые бактерии группы *Sphaeroillus*, заключенные в чехол; 21 – бактерия, образующая шипы; 22 – *Galionella*

Рисунок 2 – Разнообразие форм прокариот

2 МОРФОЛОГИЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Грибы – обширная группа гетеротрофных микроорганизмов, широко распространенных в природе. Характерной особенностью большинства грибов является образование мицелия. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов колеблется от 5 до 50 мкм. Мицелий может быть неклеточным (несептированным) или клеточным (септированным), разделенным на перегородки (септы). Грибы с несептированным мицелием относятся к низшим, с септированным – к высшим. Мицелиальные грибы, предмет изучения микробиологов, относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями в основном трех классов: зигомицетов (*Zygomycetes*), аскомицетов (*Ascomycetes*) и дейтеромицетов (*Deuteromycetes*) (несовершенные грибы).

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 врастает 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.

Грибы имеют разнообразные способы размножения – вегетативное, бесполое, половое. Органы бесполого и полового размножения грибов чрезвычайно разнообразны по строению и являются основой классификации этих организмов.

Все микроскопические грибы могут размножаться *вегетативно* кусочком мицелия.

Бесполом размножением называется размножение с образованием специализированных органов, появлению которых не предшествует предварительное слияние клеток или объединение ядер. Самый обычный способ бесполого размножения у грибов – размножение посредством спор, образующихся на специализированных органах. Споры грибов очень разнообразны по форме: круглые, овальные, цилиндрические, игловидные, звездчатые и т.д. Они варьируют в цвете и в

размерах. По строению споры могут быть одноклеточными и многоклеточными.

Бесполое споры у одних грибов образуются в специальныхместилищах – **спорангиях** – и называются спорангиоспорами, у других споры образуются открыто на специализированных гифах или на мицелии различными способами и называются **конидиями** (рисунок 3). **Спорангий** – закрытое образование, содержащее обычно большое количество спорангиоспор. Образуется спорангий на специализированной гифе, называемой спорангиеносцем. **Конидии** образуются на гифах, называемых конидиеносцами. Конидиеносцы имеют разнообразный тип ветвления, могут образовывать на вершине различные вздутия и выросты – стеригмы или фиалиды.

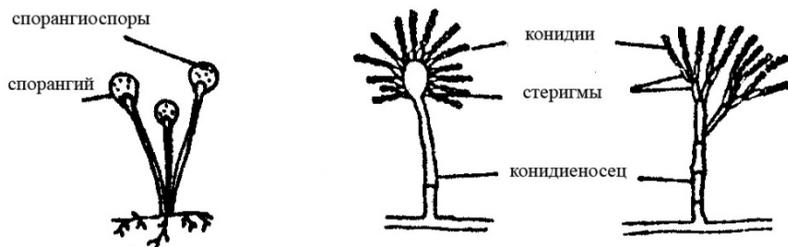


Рисунок 3 – Спорангиоспоры и конидии у мицелиальных грибов

Рассмотрим характеристику трех классов мицелиальных грибов и основных родов, принадлежащих к этим классам.

Класс Зигомицеты – низшие грибы, имеют хорошо развитый ветвистый одноклеточный мицелий, размножаются половым и бесполом путем: бесполое размножение происходит с помощью спор, развивающихся в спорангиях; при половом процессе (оогамии) образуются зигоспоры, или ооспоры.

Представитель этого класса – род *Mucor* развивается в виде войлочного белого или серого налета на продуктах растительного происхождения (на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах) и на стенах сырых помещений. У *муко́ра* (сем. *Mucoraceae*) от одноклеточного мицелия отходят одноклеточные гифы-спорангиеносцы, которые заканчиваются шаровидным утолщением – спорангием (плодовым телом). В спорангиях бесполом путем образуются многочисленные спорангиоспоры (рисунок 4). При разрыве спорангия споры выходят во внешнюю среду и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени.



Рисунок 4 – Форма спорообразования у грибов рода *Mucor*

Для просмотра мукоровых грибов следует осторожно взять препаровальной иглой небольшое количество мицелия и другой препаровальной иглой снять его на сухое предметное стекло. Препарат сначала рассматривают без покровного стекла при малом увеличении микроскопа. Видны спорангиеносцы и круглые темные шарики на их концах – спорангии. Обычно они покрыты тонкими шипами из кристаллов оксалата кальция. Затем на поверхность препарата наносят каплю воды, накрывают его покровным стеклом. Оболочка спорангия при этом разрушается, и споры выпадают. Препарат рассматривают последовательно при малом и большом увеличениях (без иммерсии).

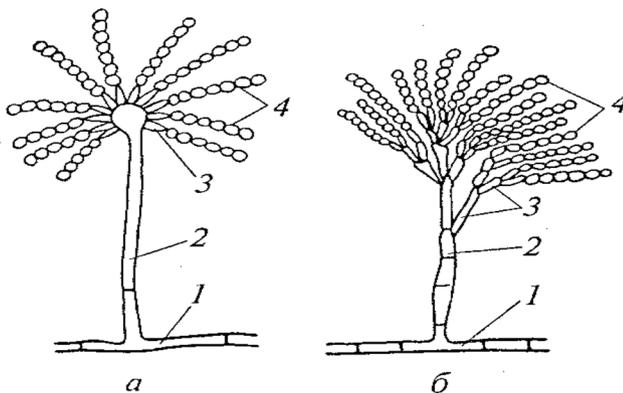
Многие мукоровые грибы являются возбудителями порчи различных пищевых продуктов. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Некоторые мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов. В странах Востока их применяют наряду с дрожжами в производстве алкогольных напитков и при изготовлении специфических продуктов питания, сброженных из бобов сои.

Класс Аскомицеты (сумчатые грибы) – высшие грибы с многоклеточным или членистым мицелием, образующие споры в сумках – асках. Они включают представителей **эуаскомицетов** (истинных аскомицетов), у которых сумки со спорами формируются в результате

полового процесса на поверхности или внутри плодовых тел, образуемых сплетением гиф мицелия (возможно бесполое размножение экзогенно возникающими спорами – конидиями), и *гемиаскомицетов*, у которых плодовые тела отсутствуют. К гемиаскомицетам относят большинство дрожжей, рассматриваемых отдельно.

Эуаскомицеты включают два важнейших рода почвенных грибов: *Aspergillus* и *Penicillium*, которых нередко **называют также плесневыми грибами**. К группе плесневых относят и некоторых представителей зигомицетов и несовершенных грибов.

Род *Aspergillus*, или *леечная плесень* (рисунок 5а), имеет хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние концы их 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 шаровидные или эллипсоидные, гладкие, бородавчатые или шиповатые. Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску: бежевую, темно-коричневую, желтовато-зеленую, зеленую, темно-серую, черную, что определяет наряду с другими признаками их видовую принадлежность. Мицелий у грибов не окрашен.



1 – вегетативный мицелий; 2 – конидиеносец;
3 – стеригмы; 4 – конидии

Рисунок 5 – Конидиеносцы у грибов рода *Aspergillus* (а) и *Penicillium* (б)

Для ознакомления со строением конидиеносцев аспергилла на примере *Aspergillus niger* препаровальной иглой берут небольшое количество мицелия на границе между черным и коричнево-бурым участками колонии и вносят в каплю воды на предметном стекле. Сверху на мицелий кладут покровное стекло. Поскольку мицелиальная пленка гриба довольно толстая, может получиться так, что под покровным стеклом вода не будет целиком окружать исследуемый мицелий. В этом случае надо из капельницы добавлять воду под покровное стекло до тех пор, пока кусочек мицелия не будет со всех сторон окружен водой. Затем слегка надавливают на покровное стекло в центре стеклянной палочкой (или препаровальной иглой). Избыток воды можно удалить фильтровальной бумагой.

В начальной стадии спорообразования *Aspergillus* похож на *Mucor* (бесцветные головки), затем с возрастом головки покрываются стеригмами, на которых развиваются споры. В результате получаются так называемые «кудрявые головки». От мукора аспергилл всегда можно отличить наличием таких головок. У мукора головки гладкие – «лысые», так как споры его эндогенного происхождения (внутренние), а у аспергилла и пеницилла – экзогенные споры (внешние).

Представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов, промышленных изделий и материалов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ, таких как лимонная кислота (*Aspergillus niger*), ферменты (амилаза – *Aspergillus oryzae*; пектиназа – *Aspergillus awamori*), антибиотики (аспергиллин, фумигацин, клавацин) и др., и широко используются в промышленности. Некоторые аспергиллы вызывают заболевания – аспергиллезы (дыхательных путей, кожи, слизистой полости рта) человека и животных. Имеются виды, выделяющие ядовитые для животных и человека вещества, – афлатоксины (производные кумаринов), одним из биологических действий которых является опухолеобразование.

Грибы рода *Penicillium* (см. рисунок 5б) называют *кистевиками*, так как они образуют конидии на концах мутовчаторазветвленных конидиеносцев, напоминающих кисточки разной степени сложности. Конидии бывают зеленой, голубой, серо-зеленой окраски или неокрашенными.

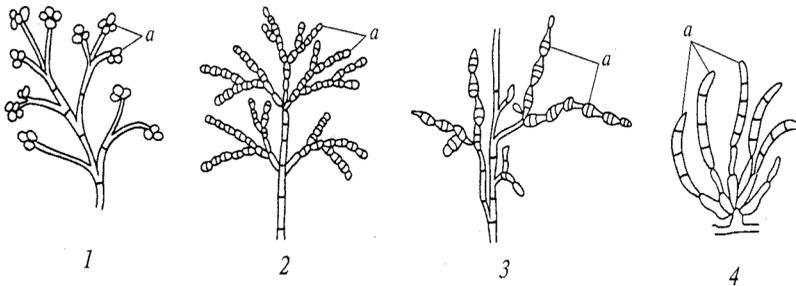
Для рассмотрения строения конидиеносцев *Penicillium* препаровальной иглой вырезают кусочек мицелия (приблизительно 0,5 мм²) на границе между его зеленым и белым участками. Осторожно с помощью двух препаровальных игл кусочек мицелия снимают со среды и

помещают в каплю воды на предметное стекло. Далее поступают так же, как и при просмотре аспергилла.

Препарат сначала просматривают при малом увеличении, уделяя основное внимание его краям, так как на них обычно хорошо видны кисты конидиеносцев. Когда подходящий участок найден, переходят с объектива 8 на объектив 40 и детально рассматривают кисточки. Во время просмотра при малом увеличении конденсор опускают, при переводе на объектив 40 снова регулируют освещенность поднятием конденсора.

В биотехнологии грибы этого рода используются как продуценты ферментов (каталазы – *Penicillium vitale* и др.), липидов, антибиотиков (пенициллина – *Penicillium notatum*; гризеофульвина – *Penicillium griseofulvum*), а также используются в пищевой промышленности (например для созревания сыров «Рокфор» (*Penicillium roqueforti*) и «Камамбер» (*Penicillium camemberti*) и т.д.).

Класс Дейтеромицеты (несовершенные грибы) имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно участками гифов. В природе широко распространены представители родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, которых формально относят к дейтеромицетам (рисунок 6). Встречаются они на растительных остатках, плодах, семенах и в почве.



1 – *Trichoderma*; 2 – *Cladosporium*; 3 – *Alternaria*; 4 – *Fusarium*
а – конидии

Рисунок 6 – Конидиеносцы и конидии несовершенных грибов

Род *Alternaria* характеризуется своеобразными многоклеточными темноокрашенными булавовидными конидиями (спорами) с поперечными и продольными перегородками, грушевидной или заостренно-

вытянутой формы. Споры располагаются одиночными или соединенными в цепочки, сидящими на слабо развитых конидиеносцах. Колонии вначале светлые, пушистые, затем зеленовато-серые или оливково-черные, бархатистые, ворсистые. Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов (*альтернариоз*). Развиваясь на пищевых продуктах, альтернария образует на них черные вдавленные пятна.

Род *Fusarium* поражает плоды, овощи и злаки. Мицелий гриба бывает разных цветов (белый, бело-розовый, желтоватый, сиреневый). Для этой плесени характерны два типа конидий: *макроконидии* – серповидно-изогнутые многоклеточные, которые развиваются на коротких разветвленных конидиеносцах, и *микрoконидии* – более мелкие эллиптические или округлые одноклеточные.

Среди грибов рода *Fusarium* есть сапрофиты, живущие в почве и на растительных остатках, и паразиты, вызывающие заболевания многих видов растений (увядание, гнили корней, стеблей, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян, различные пигментации органов растений). Поражая растения, они вызывают болезнь фузариоз. Если такие грибы встречаются на перезимовавшем хлебе, они могут вызывать фузариотоксикоз (народное название «пьяный хлеб»).

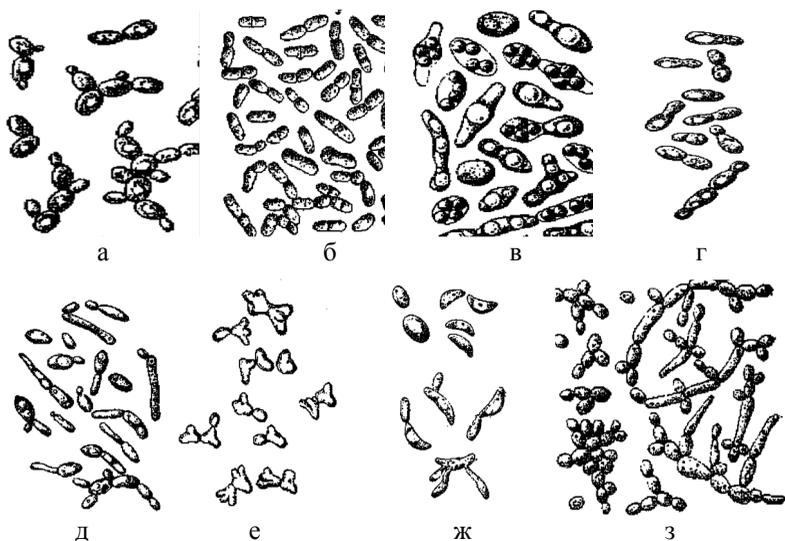
Грибы рода *Trichoderma* нередко можно обнаружить на коре, древесине, засохших листьях и стеблях, а также на семенах различных трав, кустарников и деревьев; их легко выделить из почвы на подкисленном сусло-агаре. Через 2–3 дня инкубации при температуре от 23 до 25 °С на поверхности среды появляется сначала белый, затем с оттенками зеленовато-желтого цвета войлочный налет, образованный мицелием и скоплением конидиеносцев. С возрастом он становится темно-зеленым.

При большом увеличении микроскопа видны прямостоячие, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, приподнимающиеся над мицелием. На вершине конидиеносцев расположены шаровидные головки, каждая из которых состоит из 10–20 одноклеточных бесцветных конидий. Представители этого рода энергично разрушают белковые соединения и разнообразные углеводы. Обладая антибиотическими свойствами в отношении других грибов, в том числе паразитических, триходерма выполняет оздоровляющую функцию в почве.

3 МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Дрожжи являются одноклеточными неподвижными микроорганизмами, широко распространенными в природе; они встречаются в почве, на листьях, стеблях и плодах растений, в разнообразных пищевых субстратах растительного и животного происхождения. Дрожжи относятся к царству грибов (*Fungi*), порядку одноклеточных грибов (*Unicellomycetales*). Большинство дрожжей относятся к классу сумчатых грибов (*Ascomycetes*), к подклассу голосумчатых, не образующих мицелия. Разделение голосумчатых грибов на порядки, семейства, роды основано на особенностях их размножения, морфологических, физиологических и биохимических признаках. Также ряд дрожжей относят к семейству дейтеромицетов (несовершенных грибов).

Форма клеток дрожжей чаще округлая, овально-яйцевидная или эллиптическая, реже цилиндрическая и лимонovidная. Встречаются дрожжи особой формы – серповидные, стреловидные, треугольные и др. (рисунок 7).



а – овальная яйцевидная; б – цилиндрическая; в – лимонovidная;
г – колбовидная; д – стреловидная; е – треугольная; ж – серповидная;
з – мицелиевидная

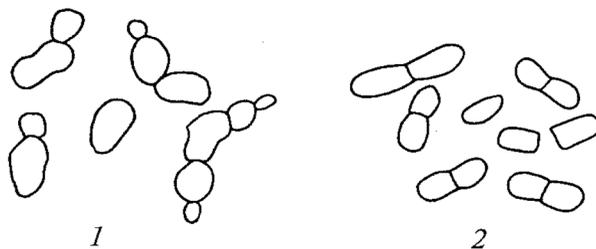
Рисунок 7 – Формы дрожжевых клеток

Размеры клеток у разных видов дрожжей варьируют от 2–3 до 20–50 мкм в длину, ширина обычно не превышает 10 мкм. Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды и способа культивирования.

Строение клетки дрожжей сходно со строением клетки грибов. Дрожжи обладают всеми основными структурами, характерными для эукариотного типа клетки (ядро, отграниченное от цитоплазмы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, рибосомы, вакуоли). В качестве запасных питательных веществ в клетках обнаруживаются капельки жира, гранулы гликогена, волютина.

Клеточная стенка дрожжей слоиста, в состав ее у большинства дрожжей входят в основном (до 60–70 % сухой массы) гемицеллюлозы; в меньших количествах – белки, липиды, хитин. У некоторых дрожжей оболочка может в той или иной степени ослизниться, вследствие чего клетки склеиваются друг с другом и, при развитии в жидких средах, образуют оседающие на дно сосуда хлопья. Такие дрожжи называют хлопьевидными, в отличие от пылевидных, клеточные стенки которых не ослизняются; пылевидные дрожжи в жидкости находятся во взвешенном состоянии.

Наиболее характерным и широко распространенным у дрожжей вегетативным способом размножения является почкование, лишь немногие дрожжи размножаются делением (рисунок 8).



1 – почкование; 2 – деление

Рисунок 8 – Способы вегетативного размножения дрожжей

Процесс почкования заключается в том, что на клетке появляется бугорок (иногда их несколько), который постепенно увеличивается. Этот бугорок называют почкой. Почкованию предшествует разделение ядра на две части, и оно вместе с частью цитоплазмы и другими клеточными элементами переходит в формирующуюся молодую клетку.

По мере роста почки в месте соединения ее с материнской клеткой образуется перетяжка, отграничивающая молодую дочернюю клетку, которая затем либо отделяется от материнской клетки, либо остается при ней. В месте отделения дочерней клетки остается рубец. При благоприятных условиях этот процесс длится около 2 ч.

Почкующиеся клетки обычно образуют не одну, а несколько почек. Вместе с этим может начаться почкование и молодых клеток. Так постепенно образуются скопления из многих объединенных между собой клеток, называемые *сростками почкования*.

Помимо почкования, многие дрожжи размножаются с помощью спор. Споры у дрожжей могут образовываться бесполом и половым путями. В первом случае ядро клетки делится на столько частей, сколько образуется спор у данного вида дрожжей, после чего постепенно в клетке (как в сумке) образуются аскоспоры. Образованию спор половым путем предшествует слияние (копуляция) клеток. У некоторых дрожжей копулируют прорастающие споры. Число спор в клетке разных видов дрожжей различно. Их может быть две, четыре, а иногда восемь и даже двенадцать.

Споры большинства дрожжей округлые или овальные, но у некоторых – игловидные, шляповидные. На поверхности многих спор имеются различные образования типа выростов, бородавок, ободков. Споры дрожжей более устойчивы к неблагоприятным воздействиям, чем вегетативные клетки, но менее стойки, чем бактериальные споры. В благоприятных условиях они прорастают в клетки. Таким образом, образование спор у дрожжей – это одновременно и процесс размножения и формирования устойчивых форм. Среди дрожжеподобных организмов есть аспорогенные, которые не способны к половому процессу и спорообразованию. Они относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Широкое использование этих дрожжей в промышленности основано на их способности вызывать спиртовое брожение, т.е. сбраживать сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопечкарном производстве, в производстве этилового спирта, пивоварении и квасоварении используются дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* (сахаромицес церевизия) – дрожжи округлой или овальной формы. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются дрожжи *Saccha-*

romyces carlsbergensis. Сахаромицес вина (*Sacch. vini*) – дрожжи эллиптической формы, их используют преимущественно в виноделии. Каждое производство применяет свои специфические расы (разновидности) данного вида дрожжей.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, 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 (збраживание, прокисание).

Из аспорогенных дрожжей, относящихся к классу дейтеромицетов, наибольшее значение имеют роды кандиды (*Candida*) и торулопсис (*Torulopsis*). Многочисленные представители их широко распространены в природе, большинство неспособно к спиртовому брожению, многие вызывают порчу пищевых продуктов.

Торулопсис имеет клетки округлой или овальной формы. Многие из них способны вызывать лишь слабое спиртовое брожение. Отдельные виды используют в производстве кумыса и кефира, например, вид *Torulopsis kefir* входит в состав симбиотической закваски – кефирного грибка.

Кандида – дрожжи, клетки которых имеют вытянутую форму, способны к образованию примитивного мицелия (псевдомицелий). В последнее время дрожжи вида Кандида утилизуют широко применяют в промышленности для получения кормового белка, аминокислот, витаминов и ферментов. Например, синтезирует белок при выращивании его на отходах бумажной промышленности. Некоторые виды, окисляющие сахар и этиловый спирт в органические кислоты или в углекислый газ и воду, являются вредителями в производствах вин, пива, пеккарских дрожжей. Эти дрожжи вызывают порчу квашеных овощей, безалкогольных напитков и многих других продуктов.

Имеются виды, вызывающие заболевания – кандидозы у людей, при которых поражаются слизистые оболочки рта и других органов.

Среди аспорогенных дрожжей имеются окрашенные в желтый, розовый, красный цвета, что обусловлено наличием в клетках пигментов – каротиноидов. В настоящее время некоторые из этих дрожжей (виды рода родоторула – *Rhodotorula*) используют для получения кормовых белково-каротиноидных препаратов, которые являются источником витамина А для животных.

4 ИЗУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Морфологические особенности клеток микроорганизмов можно изучать с помощью различных методов микроскопии, а также применяя некоторые способы дифференциальной окраски. Выбор методов микроскопического анализа и способов окраски определяется конкретной целью исследования. Однако существует ряд приемов, которые имеют принципиальное значение и лежат в основе большинства специальных методов исследования морфологии и цитологии бактерий, – *способы приготовления препаратов, фиксации и окраски клеток.*

4.1 Подготовка стекол

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2–1,4 мм. Более толстые стекла не позволяют получить резкое изображение краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата, так как оно оказывается в толще стекла, а это нарушает фокусировку конденсора и резко снижает четкость изображения. Толстые предметные стекла недопустимы при работе с иммерсионным объективом, когда необходимо полностью использовать числовую апертуру системы.

Существенным моментом является подготовка поверхности предметных стекол, что особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в выпуклые, медленно высыхающие капельки. Наиболее надежный способ обезжиривания – обработка стекол хромовой смесью с последующим споласкиванием водой и спиртом. В повседневной работе, однако, вполне достаточно бывает тщательно натереть сухое стекло мылом, после чего вытереть его чистой хлопчатобумажной салфеткой. Хорошее обезжиривание достигается протиранием вымытых и высушенных стекол ватой, смоченной эфиром (после этого промывание водой не требуется), или обжиганием поверхности стекол в пламени горелки (жир при этом сгорает). Запрещается кипячение стекол в растворах щелочей, в том числе моющих средствах, а также длительное выдерживание стекол в таких растворах, так как щелочи разъедают стекло, делая его поверхность матовой. Хранить чистые обезжиренные стекла можно в сухом состоянии или в этаноле.

Покровные стекла, применяемые для приготовления препаратов микроорганизмов, также должны быть тщательно вымыты и высуше-

ны. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15–0,17 мм. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

4.2 Правила работы с бактериологической петлей

Бактериологическую петлю или иглу перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку прокалывают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. При прокаливании петлю держат в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерно раскалена. Сразу после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю (иглу) вначале охлаждают, прикасаясь к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле после приготовления препарата, сжигают в пламени горелки. В этом случае прокалывание петли начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсохли и не образовывали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводят в вертикальное положение, прокалывают докрасна и только после этого ставят на место.

4.3 Отбор клеток микроорганизмов

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом.

Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю и держат ее, как карандаш, прокалывают в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают наружный конец ватной пробки к ладони и вынимают пробку из пробирки, края открытой пробирки слегка обжигают в пламени горелки, вводят в пробирку стерильную петлю и, отобрав небольшое количество микробной массы, вынимают петлю из пробирки. Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают внутренний конец ватной пробки и закрывают ею пробирку, которую ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата (рисунки 9).

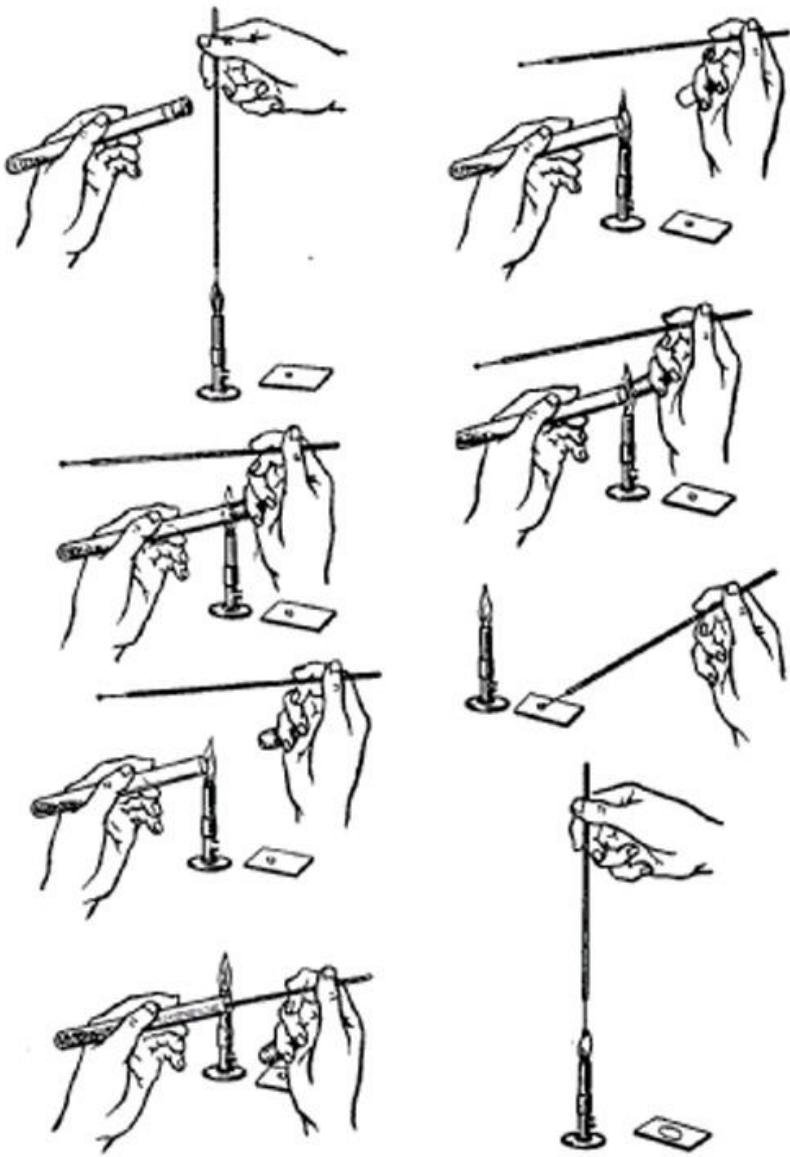


Рисунок 9 – Последовательность отбора клеток микроорганизмов

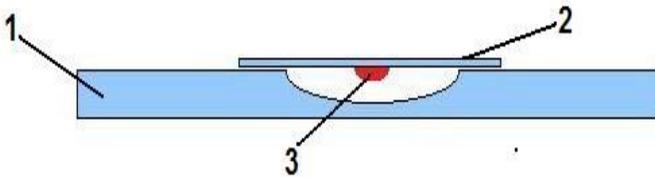
4.4 Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов

Для изучения живых клеток микроорганизмов применяют препараты «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток», «агаровая пленка» («микрочультура»). Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Для этого покровное стекло ставят на ребро у края капли и, опуская, постепенно вытесняют воздух, находящийся между предметным и покровным стеклами, чтобы избежать образования пузырьков. Микроорганизмы, выращенные как на плотной, так и в жидкой питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей; кроме того, выращенные в жидкой среде микроорганизмы можно также переносить стерильной пипеткой. В последнем случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы из-под покровного стекла не выступал избыток жидкости. Если он образовался, его необходимо удалить фильтровальной бумагой. При продолжительном изучении микроскопируемого объекта края покровного стекла рекомендуется залить лаком для ногтей, что предотвратит быстрое высыхание препарата.

Препарат «раздавленная капля» используют для установления формы клеток микроорганизмов, их размеров и взаимного расположения, способа спорообразования, наличия или отсутствия подвижности.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки (рисунок 10). Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. Препарат микроскопируют при затемненном поле зрения, сначала при малом, затем при среднем или большом увеличении. На светлом фоне микробы темно-серые.



1 – предметное стекло с углублением в центре; 2 – покровное стекло;
3 – капля суспензии микроорганизмов

Рисунок 10 – Препарат «висячая капля»

Препарат «висячая капля» используют для наблюдения за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор, для выявления подвижности и отношения клеток к химическим раздражителям и т.д. При работе с бактериями этот метод используется редко.

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего (1:40) на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом.

Препарат «микрокультура» (или «агаровая пленка»). На тонкое простерилизованное и нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,2–0,3 мл горячей агаризованной питательной среды и распределяют по всей поверхности стекла. После застывания среды удаляют петлей лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов бактериальной петлей или пипеткой наносят каплю жидкой культуры или суспензии клеток микроорганизма. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку с выросшей микрокультурой наносят каплю красителя или каплю воды в случае подсыхания пленки и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Выращивание микроорганизмов непосредственно на предметном стекле позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами

их роста и развития, изучать цикл развития, способ размножения (деление почкование), влияние на эти процессы каких-либо агентов. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей микроколони. Выращивание микроколони можно проводить в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом, загерметизированным лаком) условиях.

4.5 Приготовление препаратов фиксированных клеток

Получение фиксированных окрашенных препаратов включает *приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.*

Приготовление мазка. Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла. 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 средой или из жидкого материала.* Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериологической петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету. Либо можно каплю равномерно размазывать петлей на площади не более 4 см² (площадь покровного стекла) максимально тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонок, чтобы быстро высохал после приготовления.

2. *Приготовление мазка из культур с плотной питательной средой.* На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю водопроводной воды, в нее вносят бактериологическую 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 описанным выше способам.

Высушивание мазка лучше всего производить при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание происходит медленно, препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить осторожно, не перегревая мазок, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

Фиксация препарата преследует несколько целей: убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;

обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу; сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые. Самым распространенным способом фиксации является *термическая обработка*. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или большим и указательным пальцами правой руки за ребра мазком вверх и плавным движением проводят обычно трижды через наиболее горячую часть пламени горелки. 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 ощущение ожога. Не следует перегревать мазок, так как при этом происходят грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например их сморщивание. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными *химическими веществами*. Фиксирующую жидкость наливают на мазок либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксирующим раствором (таблица 1).

Таблица 1 – Вещества для химической фиксации

Фиксирующее вещество	Время фиксации, мин
Метиловый спирт безводный	3–5
Этиловый спирт, 96 %	10–15
Жидкость Никифорова (смесь спирта и наркотного эфира в соотношении 1:1)	10–15
Жидкость Карнуа (смесь спирта 96%-ного – 60 мл; хлороформа – 30 мл; уксусной кислоты ледяной – 10 мл)	10–15
Формалин (40%-ный)	Несколько секунд
Пары осмиевой кислоты (при работе следует соблюдать осторожность, так как пары осмия могут повредить глаза!)	Несколько секунд
Ацетон	5
Спиртформол (40%-ный формалин – 5 мл; этиловый 96%-ный спирт – 95 мл)	5–15
Жидкость Руге (40%-ный формалин – 20 мл; ледяная уксусная кислота – 1 мл; вода дистиллированная – 100 мл)	5
Фосфорномолибденовая кислота (5%-ный водный раствор)	5

Окраска. Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой (заранее пропитанная красителем фильтровальная бумага), что было предложено А.И. Синевым. Простота приготовления, удобство применения, а также возможность хранения красящей бумаги в течение неограниченно долгого времени явились основанием для широкого их использования при различных способах окраски.

Окраска мазков красящей бумагой. На высушенный и фиксированный препарат наносят несколько капель воды, кладут окрашенные бумажки величиной 2×2 см. В течение всего времени окрашивания бумага должна оставаться влажной и плотно прилегать к поверхности стекла. При подсыхании бумагу дополнительно смачивают водой. Продолжительность окрашивания мазка определяется методом окраски. По окончании окраски бумагу осторожно снимают пинцетом, а мазок промывают водопроводной водой и подсушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

Окраска мазков растворами красителей. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей хромофором является катион. Примерами кислых красителей служат: эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллвиолет, сафранин – интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Различают *простое и сложное (дифференциальное)* окрашивание микроорганизмов. В первом случае прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определенные структуры клетки и запасные вещества.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные палочки, лежащие над лотком (подставка-мостик для мазков), пипеткой наносят раствор красителя в таком количестве, чтобы он покрывал весь мазок и выдерживают в течение 1–3 мин. Следят затем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в слу-

чае необходимости добавляют новую порцию красителя. При окраске мазков концентрированными растворами красителей (карболовый фуксин Циля, карболовый генциановый или кристаллический фиолетовый) окрашивание производят через фильтровальную бумагу, задерживающую частицы красителя: на фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом 90×. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки.

Фиксировать и окрашивать можно также и препараты-«отпечатки». Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться до трех месяцев. Постоянный препарат отличается от фиксированного более длительным сроком хранения (до нескольких лет); это обычный фиксированный препарат, который накрывают покровным стеклом и заливают канадским бальзамом.

Форму клеток и их расположение (цепочки, розетки, пакеты, тетрады и т.д.) выявляют, как правило, на препаратах «раздавленная капля» при светлопольной или фазово-контрастной микроскопии. Для определения формы клеток мелких палочковидных бактерий, таких как *Serratia marcescens*, готовят препарат фиксированных клеток и применяют простое окрашивание. Клетки мелких бактерий, имеющих выросты – простеки (роды *Caulobacter*, *Labrys*, *Prosthecomicrobium*, *Stella* и некоторые другие), целесообразно исследовать методом фазового контраста или в темном поле. Естественное расположение клеток в колонии микроорганизмов, а также спор и спораносцев у актиномицетов и мицелиальных грибов изучают на препарате «отпечаток».

Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

4.6 Определение размеров клеток микроорганизмов

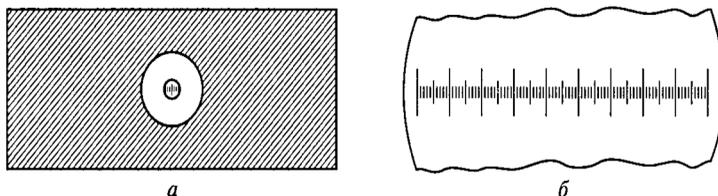
Клетки микроорганизмов измеряют под микроскопом с помощью окулярной линейки – микрометра или окулярного винтового микрометра. Для измерения лучше использовать живые, а не фиксированные

клетки, так как фиксация и окраска приводят к некоторому изменению истинных размеров клеток. Размеры клетки удобно определять с помощью фазово-контрастного устройства. Если клетки подвижны, препарат слегка подогревают или к капле исследуемой суспензии добавляют каплю 0,1%-ного водного раствора агара. Размеры клеток выражают в микрометрах.

Окулярный микрометр (окуляр-микрометр) представляет собой круглую стеклянную пластинку, в центре которой выгравирована линейка длиной 5 мм. Линейка разделена на 50 частей. Окулярный микрометр вставляют в окуляр. Для этого вывинчивают глазную линзу окуляра, помещают на его диафрагму окулярный микрометр делениями вниз и завинчивают линзу. Однако только с помощью окуляр-микрометра нельзя непосредственно измерить величину клетки, так как последние рассматриваются через объектив и окуляр, а деления линейки – только через верхнюю линзу окуляра. Поэтому, прежде чем приступить к измерению величины клеток, необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа. Это делают с помощью объективного микрометра.

Объективный микрометр (объект-микрометр) – это металлическая пластинка с отверстием в центре (рисунок 11). В отверстие вставлено стекло, на которое нанесена линейка длиной 1 мм. Она разделена на 100 частей, т.е. деление объективного микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мкм. Для определения цены делений окулярного микрометра объективный микрометр помещают на столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого меняют объектив на тот, при котором будут определяться размеры клеток. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую. Цену деления окулярного микрометра определяют по принципу нониуса, т.е. совмещают одно из делений шкалы окулярного и объективного микрометров и находят следующее их совмещение. Устанавливают, скольким делениям объективного микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра. Например, 2 деления объект-микрометра (20 мкм) соответствуют 5 делениям окуляр-микрометра. Следовательно, одно деление окуляр-микрометра равно 4 мкм (20:5). Если теперь на столик микроскопа поместить препарат с клетками микроорганизмов и рассматривать его при том же увеличении, то

можно измерить величину клетки. Для этого определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует величина измеряемого объекта, и умножают это число на цену деления окулярного микрометра.



а – общий вид; б – вид под микроскопом

Рисунок 11 – Объективный микрометр

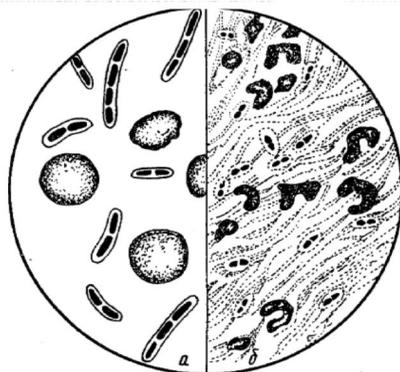
Удобно определять размеры клеток с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-15. Винтовой окулярный микрометр закрепляют на тубусе микроскопа, предварительно вынув окуляр. В окуляре винтового микрометра имеется неподвижная шкала с ценой деления 1 мм для определения размеров крупных объектов и подвижная стеклянная пластинка с перекрестием. Пластинка связана с микрометрическим винтом-барabanом и перемещается вместе с перекрестием при его вращении. Для измерения длины клетки вращением микрометрического винта-барабана окулярного микрометра подводят перекрестие к концу клетки и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до другого конца клетки и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует длина клетки, и умножают полученное значение на цену деления барабана при данном увеличении микроскопа.

Цену деления барабана для каждого объектива определяют с помощью объективного микрометра. С этой целью подводят перекрестие к началу одного деления объективного микрометра и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до конца деления объективного микрометра и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует одно деление объективного микрометра. Например, одно деление объективного микрометра, т.е. 10 мкм, соответствует делениям микрометрического винта-барабана; следовательно, одно деление его при данном увеличении микроскопа равно $10 \cdot X$ (мкм).

Для получения достоверных результатов необходимо измерить не менее 20–30 клеток. При определении размеров клеток округлых форм измеряют их диаметр, у клеток других форм – длину и ширину; указывают средние размеры клеток и пределы колебаний, т.е. минимальные и максимальные размеры.

4.7 Выявление клеточных структур и запасных веществ

Капсулы. Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте на средах, богатых углеводами, могут быть окружены рыхлым внешним слоем – капсулой или слизью. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток. Химический состав капсул у разных бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски. Кроме того, капсулы при окраске легко деформируются, а вещество капсулы слабо связывает краситель, который легко отмывается в процессе обработки препарата. Чаще всего для выявления капсул применяют способ «негативной» окраски (негативного контрастирования) с помощью жидкой туши. Для этого небольшое количество клеток с плотной среды помещают в каплю разбавленного фуксина, смешивают с каплей туши, закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом 40 . На общем темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки микроорганизмов, окрашенные в розовый цвет (рисунок 12). Кроме того, существуют специальные методы окраски капсул, один из них приведен ниже.



а – бацилла сибирской язвы; б – диплококк

Рисунок 12 – Капсула у бактерий

Выявление капсул по методу Гинса. На конец предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю черной туши, вносят в нее клетки, хорошо перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности предметного стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют от 5 до 10 мин смесью Никифорова или 3 мин абсолютным метанолом. Далее мазок окрашивают карболовым фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3. Время окрашивания – 2–3 мин. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой. На темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Клеточная стенка. Тонкую структуру клеточной стенки хорошо видно лишь при электронной микроскопии. Для наблюдения клеточной стенки при световой микроскопии применяют метод темного поля либо специальную окраску, с помощью которой удастся легко выявить границы между отдельными клетками, расположенными в виде длинных нитей или плотных агрегатов. На обезжиренном стекле делают мазок клеток исследуемых бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 5 мин 5%-ным раствором фосфомолибденовой кислоты. Затем препарат промывают водой и окрашивают не более 15 с 0,02%-ным раствором кристаллвиолета. Снова промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клеточная стенка окрашивается в черный, а цитоплазма – в бледно-сиреневый цвет.

Окраска по Граму. С молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки связывают способность бактерий окрашиваться по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда все бактерии делятся на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином или сафранином они приобретают розовую окраску.

По Граму рекомендуется окрашивать клетки молодых, чаще всего суточных, культур, так как способность удерживать краситель зависит от физиологического состояния бактерий. Например, некоторые бактерии после прекращения активного роста теряют способность окрашиваться по Граму.

Техника окраски:

1. На хорошо обезжиренном предметном стекле делают тонкий мазок клеток исследуемой культуры.

2. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1–2 мин раствором карболового генцианвиолета (или кристаллвиолета). Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1%-ным спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А.В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2 мин.

3. Затем краситель сливают и, не промывая мазок водой, обрабатывают его 1–2 мин раствором Люголя до почернения.

4. Сливают раствор Люголя, препарат обесцвечивают, непрерывно покачивая, в течение 0,5–1,0 мин 96%-ным этиловым спиртом.

5. Быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 1–2 мин фуксином Пфейфера.

6. Краситель сливают, мазок промывают в идущей под углом струе водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке, подсушивают чистой фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грамотрицательные – розово-красный цвет.

Особенно ответственным моментом в окраске по Граму является обесцвечивание мазка спиртом. При коротком воздействии спирта получают перекрашенные препараты, а при длительном все микробы (в том числе и грамположительные) обесцвечиваются. На густой, толстый мазок (например, из агаровой культуры) время воздействия спиртом должно быть большим, нежели на тонкий мазок, особенно с жидких культур. При воздействии спиртом на неравномерно приготовленный мазок в толстых его частях микробы остаются необесцвеченными, а в тонких обесцвечиваются; получится «пестрая» картина окраски, что может привести к неправильным выводам.

При обесцвечивании препарата в окраске по Граму спирт можно наливать непосредственно на мазок, постоянно покачивая стекло. Лучше же обесцвечивание проводить в кюветках, куда наливают спирт и, захватив пинцетом Корнэ препарат, поднимают и опускают его, следя за цветом стекающего со стекла спирта. Обесцвечивание считается законченным, когда стекающие с мазка капли спирта сравниваются по цвету со спиртом в кюветке.

Для начинающих, а также в сомнительных случаях, рекомендуется на том же стекле, где находится исследуемый мазок, приготовить по сторонам контрольные препараты – один из культуры микробов, заведомо грамположительных, а другой – из грамотрицательных.

Выявление кислотоустойчивости клеток. Кислотоустойчивость – свойство, характерное для некоторых микобактерий и нокардий: при обработке кислотой их окраска сохраняется. Кислотоустойчивость обусловлена особенностями химического состава клеточной стенки этих бактерий – высоким содержанием в ней сложных липидов и, в частности, наличием миколовых кислот.

Наибольшее распространение получил способ выявления кислотоустойчивости по Циль–Нильсену. На обезжиренном предметном стекле готовят два мазка: исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых микобактерий. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препарат карболовым фуксином Циля и затем 2–3 раза подогревают до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку, и при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. Дают препарату остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой. Затем препарат обесцвечивают 5%-ным раствором H_2SO_4 . Для этого предметное стекло погружают 2–3 раза в стакан с кислотой, не задерживая его в ней. Вновь тщательно промывают препарат водой и докрашивают 3–5 мин метиленовым синим по Леффлеру. Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсионной системой. При строгом соблюдении режима окраски кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, тогда как некислотоустойчивые – синий. Кислотоустойчивость можно определить у клеток любого возраста.

Жгутики. Способность к движению у большинства микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. Расположение и количество их у различных бактерий варьирует и имеет диагностическое значение. Особенно важен этот признак для идентификации палочковидных грамотрицательных бактерий. По характеру движения бактерий в препарате можно предположительно судить о типе жгутикования. В зависимости от расположения и количества жгутиков микробы подразделяют (рисунк 13):

а) *монотрихи* – микроорганизмы, имеющие на одном из полюсов один жгутик, движения активные, поступательные (псевдомонас);

б) *лофотрихи* – микробы, имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков (листерии);

в) *амфитрихи* – микробы, имеющие жгутики на обоих полюсах микробной клетки;

г) *перитрихи* – микробы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки (*E. coli*).

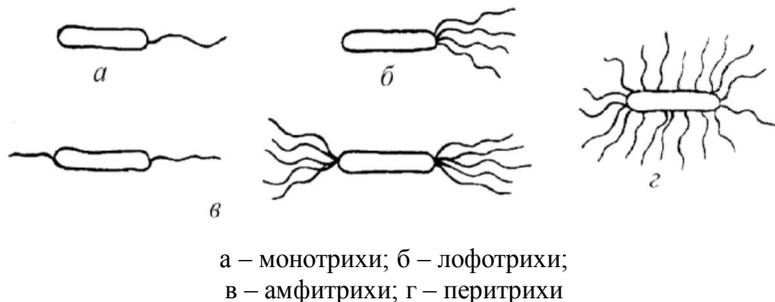


Рисунок 13 – Типы расположения жгутиков у бактерий

Если жгутики расположены на одном или на двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое – «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону; при латеральном или перитрихальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

Отдельный бактериальный жгутик настолько тонок, что неразличим в световом микроскопе, если не окрашен особым способом, который увеличивает его кажущуюся толщину. Так, диаметр отдельных жгутиков колеблется в пределах 0,01–0,02 мкм (у *Bdellovibrio* 0,04–0,06 мкм), а максимальное разрешение светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Лишь у немногих бактерий, например у представителей рода *Spirillum*, пучки жгутиков достаточно плотны, и их удается обнаружить при наблюдении в светлом поле с помощью фазово-контрастного устройства или в темном поле. Существует несколько способов окраски жгутиков. Все они основаны на использовании различных «протрав», осаждающихся на поверхности жгутиков, благодаря чему диаметр жгутиков увеличивается и они становятся видимыми под световым микроскопом. Окраска жгутиков требует тщательной подготовки клеток и аккуратности в работе, так как они легко обламываются даже при легком взбалтывании суспензии.

Окраска жгутиков по методу Леффлера в модификации Пешкова. Бактерии, предназначенные для окраски жгутиков, ежедневно в течение 2–3 дней пересевают в свежую жидкую или на плотную среду, содержащую не более 1,5 % агара. Для окраски используют

клетки 12–16-часовой культуры. Клетки осторожно берут петлей и переносят в пробирку со стерильной водой, подогретой до температуры, при которой их выращивали. Прежде чем делать мазок, каплю полученной суспензии просматривают под микроскопом и убеждаются в том, что клетки подвижны и плотность суспензии невелика: 5–10 клеток в поле зрения.

Клетки легко теряют жгутики в момент приготовления мазка, поэтому необходимо обращать внимание на чистоту стекла и способ нанесения на него суспензии. Предметные стекла должны быть тщательно обезжирены. Непосредственно перед приготовлением мазка стекло 3–4 раза проводят через наиболее горячую часть пламени горелки. Дают стеклу остыть и пастеровской пипеткой, пером перьевой ручки или петлей наносят 3–4 маленькие капли культуры на стекло. Капли должны хорошо расплываться по стеклу и быстро высыхать. Высушенный мазок заливают протравой. Необходимо следить, чтобы протрава не подсыхала. Через 15 мин протраву смывают дистиллированной водой и препарат окрашивают в течение 5 мин разбавленным фуксином Циля, погружая его мазком вниз в раствор красителя. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и исследуют с иммерсионной системой. Обращают внимание на расположение жгутиков, их количество и длину.

Нуклеоид. Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи светового микроскопа трудно. Основные красители, избирательно окрашивающие хроматин ядер эукариотических клеток, равномерно и интенсивно окрашивают всю прокариотную клетку. Для избирательного окрашивания нуклеоида фиксированные клетки предварительно обрабатывают рибонуклеазой или разбавленной соляной кислотой, чтобы разрушить рибосомальную РНК. Последующее окрашивание основным красителем позволяет выявить нуклеоид в виде плотных тел, имеющих неправильные очертания и расположенных в центре или на обоих полюсах клетки. Довольно четко нуклеоид обнаруживается у следующих бактерий: *Proteus vulgaris*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus var. mycoides*, *B. subtilis*.

Для выявления нуклеоида на предметном стекле делают мазок суточной культуры бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 2–3 мин в парах 2%-ного раствора осмиевой кислоты. С этой целью на дно чашки Петри наносят 2–3 капли фиксатора, а предметное стекло помещают мазком вниз на обрезки стекла над фиксатором. По окончании фиксации препарат опускают на 2–3 мин в стаканчик с раствором 1 н HCl для гидролиза рибосомальной РНК. Стакан держат на водяной бане при 60 °С. После гидролиза препарат немед-

ленно промывают водой. Затем мазок помещают на 15 мин в 1%-ный раствор формалина, вновь промывают водой и окрашивают в течение 1–2 мин 0,1–1,0%-ным водным раствором основного фуксина. Препарат промывают, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет, нуклеоид – в яркомалиновый.

Многие микроорганизмы содержат различные внутрицитоплазматические включения: это могут быть продукты метаболизма, «складирующиеся» внутри клетки, структуры, необходимые для энергетического (хлоросомы зеленых бактерий, в которых находятся бактериохлорофиллы, фикобилисомы циано-бактерий, содержащие пигменты фикобилипротеины) и конструктивного (карбокисомы автотрофов, состоящие из ключевого фермента цикла Кальвина – рибулозодифосфаткарбоксилазы) обмена веществ. Некоторые включения имеют приспособительное значение – это, например, газовые вакуоли, необходимые для поддержания плавучей плотности водных микроорганизмов и магнитосомы железобактерий, содержащие магнетит (Fe_3O_4), который позволяет бактериям перемещаться в направлении линий магнитного поля.

Разнообразными соединениями представлены запасные полимерные гранулярные цитоплазматические вещества микроорганизмов, которые они накапливают внутри клетки. Чаще всего это полисахариды (гликоген, крахмал, гранулёза), липиды, полифосфаты. Некоторые бактерии накапливают в клетках серу. Резервом азота являются цианофициновые гранулы цианобактерий.

Гранулы углеводной природы (полисахариды) выявляют при обработке клеток раствором Люголя. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Гранулы крахмалоподобных веществ – гранулёзы – окрашиваются в синий, а гранулы гликогеноподобных полисахаридов – в красновато-коричневый цвет. Гликоген при окраске Люголем легко выявляется у дрожжей, гранулёза характерна для бактерий рода *Clostridium*. Реакция на гликоген хорошо проходит только в кислой среде, поэтому перед выявлением в клетках гликогена среду, в которой выращивали микроорганизмы, подкисляют.

Липидные гранулы. У дрожжей и мицелиальных грибов запасные липиды представлены нейтральными жирами, которые легко обнаруживаются в живых клетках без специальных методов окраски в виде сильно преломляющих свет капель. Бактерии в качестве резерв-

ных липидов образуют поли-р-оксималяную кислоту. Гранулы поли-р-оксибутирата хорошо заметны при микроскопировании живых бактериальных клеток с фазово-контрастным устройством, однако чаще для их выявления клетки окрашивают лиофильными красителями – Суданом III или Суданом черным. Готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе и фиксируют в пламени горелки. Заливают поверхность мазка раствором Судана черного и оставляют краситель на 5–15 мин. Избыток красителя сливают, просушивают препарат фильтровальной бумагой, просветляют в ксилоле, погружая в него несколько раз предметное стекло. Время просветления препарата не должно превышать 1 мин. После этого клетки дополнительно окрашивают в течение 10 с 0,1%-ным водным раствором сафранина. Более длительная обработка сафранином нежелательна, так как маскируется основная окраска. Гранулы поли-р-оксибутирата окрашиваются в темный цвет, остальная часть клетки – в розовый.

Окраска жира. Жир содержится в клетках практически всех микроорганизмов; особенно много его накапливается при старении культуры.

1. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40%-ного раствора формалина (убивает клетку и разрыхляет оболочку).
2. Петлей в нее вносят культуру микроба.
3. Через 5 мин в эту каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего.
4. Спустя 10 мин добавляют каплю Судана III.
5. Общую каплю накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют препарат с иммерсией.
6. Цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, а включения жира в розово-оранжевый.

Полифосфаты (волютин и метакроматин). В клетках прокариот волютин локализован в цитоплазме, в клетках эукариот – в вакуолях. Окраска волютиновых гранул основана на свойстве метакроматинизации – способности вызывать изменение цвета некоторых красителей (метиленовый синий, толудиновый синий). Готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На фиксированный мазок наливают метиленовый синий по Леффлеру и окрашивают клетки в течение 10 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки окрашиваются в голубой цвет, а зерна волютина – в фиолетово-красный (рисунок 14).



Рисунок 14 – Включения волютина в клетках различных бактерий

Волютин легко выявить окраской по способу Омелянского, основанному на его плохой растворимости в кислотах. В этом случае на фиксированный в пламени горелки мазок наливают карболовый фуксин Циля и окрашивают клетки в течение 0,5–1,0 мин. Краску сливают, промывают препарат водой и обесцвечивают 1%-ным раствором H_2SO_4 в течение 20–30 с. Затем кислоту сливают, препарат промывают водой и дополнительно окрашивают 20–30 с метиленовым синим (1:40). Снова промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании гранулы волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы. Для выявления волютина у дрожжей применяют следующий способ. Фиксированный в пламени горелки мазок окрашивают метиленовым синим по Леффлеру в течение 3 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой и, не высушивая, наносят на мазок небольшую каплю 1%-ного раствора серной кислоты; мазок накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Волютин имеет вид капель сине-фиолетового цвета на слабо-голубом фоне цитоплазмы.

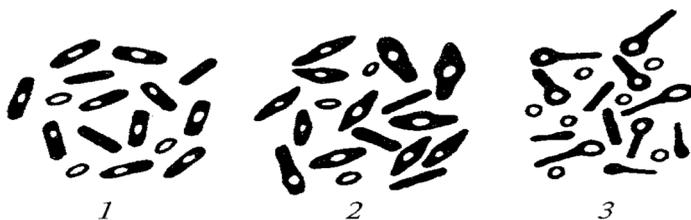
Параспоральные включения. Бактерии *Bacillus thuringiensis*, включающие более 80 подвидов, образуют параспоральные включения примерно в тот же период, что и споры. Обычно эти включения состоят из нескольких полифункциональных белков – высокоспецифичных токсинов некоторых беспозвоночных животных, также проявляющих менее специфическую антимикробную активность. В состав некоторых включений могут входить и другие белки, например цитолитические. В клетке образуется от одного до нескольких включений разных размеров, часто имеющих форму бипирамид, ромбоздров, пластинок-

параллелепипедов, ромбоидов, а также неправильных глыбок. Поэтому белковые включения часто называют параспоральными кристаллами. Их окрашивают с помощью красителей, хорошо связывающихся с белками, например амидошварцем или анилиновым черным для шерсти.

Для выявления параспоральных включений готовят тонкий мазок спорулирующей культуры, высушивают его на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и в течение примерно 1–2 мин окрашивают одним из вышеуказанных красителей, следя за тем, чтобы краситель не подсыхал. Затем осторожно смывают краску водой и мазок в течение 15–30 с докрасивают фуксином Циля или сафранином. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильной окраске кристаллы белка окрашиваются в черный, а клетки – в розовый цвет. Белковые включения образуют и другие бактерии, например *Bacillus popilliae*, *Xenorhabdus nematophilus* и др. Их окрашивают так же по вышеописанной методике.

4.8 Эндоспоры

Эндоспоры образуют бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium* и некоторых других. Для обнаружения способности клеток к спорообразованию лучше использовать старые культуры. Споры можно обнаружить при наблюдении живых клеток, а также путем дифференциального окрашивания цитоплазмы и споры. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования: бациллярный, клостридиальный, плектридиальный (рисунок 15), расположение споры в клетке (центральное, экс-центральное или полярное), форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая) и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2–3-суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры.



1 – бациллярный; 2 – клостридиальный; 3 – плектридиальный

Рисунок 15 – Типы образования эндоспор у бактерий

Наблюдение спорообразования в микрокультуре. На стерильном предметном стекле, как описано выше, получают тонкую пленку агаризованной питательной среды, благоприятной для спорообразования (например, картофельного агара). В центр пленки наносят петлей каплю жидкой 24-часовой культуры *Bacillus megaterium* или другой крупной спорообразующей бактерии. Полученный препарат инкубируют при 37 °С во влажной камере в течение 20–24 ч. Перед микроскопированием препарат подкрашивают метиленовым синим по Леффлеру и осторожно накладывают покровное стекло. Микроскопируют с иммерсией или методом фазового контраста. Просматривают край колонии, обращая внимание на расположение клеток и на клетки в разных стадиях спорообразования.

Наблюдение эндоспор в живых клетках. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры имеют вид светлых включений на фоне почти черных клеток.

Метод выявления спор негативным окрашиванием. На предметном стекле готовят тонкий мазок клеток спорующих бактерий, подсушивают на воздухе и фиксируют в пламени. Затем на 3–5 мин наносят метиленовый синий или на 1–3 мин фуксин, после чего препарат осторожно промывают водой и подсушивают на воздухе. Просматривают с иммерсией.

Вегетативные клетки бактерий прокрашиваются, а споры, имеющие многослойную, труднопроницаемую оболочку – нет. Они видны как сильно преломляющие свет сферические или овальные образования, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий. Иногда на поверхности спор откладывается тонкий белковый слой. Благодаря его прокрашиванию споры становятся видимыми, но окрашены они значительно слабее, чем клетки. Например, при окраске фуксином Цилия клетки красные, а споры светло-розовые.

Метод удобен при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста бактерий.

5 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1 «ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЗНАКОМСТВО С ИХ МОРФОЛОГИЕЙ»

Цель работы: освоить технику приготовления препаратов живых микроорганизмов и фиксированных препаратов, ознакомиться с морфологическим разнообразием микроорганизмов.

Время выполнения работы – 6 часов.

Материалы и оборудование: микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; покровные стекла; спиртовка; спички; пинцет; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксин Пфейфера); водный раствор метиленового синего; карболовый фуксин; 96%-ный этиловый спирт; лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка; кисломолочные продукты; рассол засоленных огурцов, капусты; бактериологические закваски; суспензия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Ход выполнения работы. В соответствии с описанием в теоретической части выполните следующие задания:

1. Приготовить препарат «раздавленная капля» культуры микроорганизмов из кисломолочных продуктов (простокваша, сметана, кефир, йогурт, кисломолочный бифидопродукт и др.), промикроскопировать с сухой системой (8× и 40×) и зарисовать микроорганизмы (отметить форму и сочетание клеток).

2. Приготовить препарат «висячая капля» из бактериологических заквасок, или рассола огурцов с использованием красителей (водный раствор метиленового синего либо карболовый фуксин), промикроскопировать с объективом 40× и зарисовать.

3. Приготовить фиксированный препарат с окраской по Граму из суспензии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, промикроскопировать с объективом 90×, зарисовать микроорганизмы, отметить форму и сочетание клеток.

Примечание. Объекты исследования микроорганизмов могут быть изменены преподавателем. Часть микроорганизмов может быть продемонстрирована в виде готовых препаратов.

6 ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 «ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР И ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ»

Цель работы: освоить методы выявления клеточных структур и запасных веществ, используя дифференциальные методы окраски препаратов; закрепить знания по морфологии основных групп микроорганизмов.

Время выполнения работы – 6 часов.

Материалы и оборудование: микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; покровные стекла; спиртовка; спички; пинцет; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; раствор туши для выявления капсул; 5%-ный раствор H_2SO_4 ; смесь Никифорова; карболовый фуксин Циля; метиленовый синий по Леффлеру; Судан III; 40%-ный раствор формалина; 1%-ный раствор H_2SO_4 ; раствор Люголя; метиленовый синий (1:40); метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор); 96%-ный этиловый спирт; лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка; кисломолочные продукты; рассол засоленных огурцов, капуста; бактериологические закваски; суспензия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Ход выполнения работы. В соответствии с описанием в теоретической части выполните следующие задания:

1. Приготовить микропрепарат по обнаружению спор в исследуемых культурах микроорганизмов методом негативного окрашивания, рассмотреть с иммерсией, зарисовать. В случае выявления у микроорганизмов способности к образованию спор на рисунке необходимо отметить тип спорообразования: бациллярный, кластридиальный, плектридиальный (см. рисунок 15), расположение споры в клетке (центральное, эксцентральное или полярное) и форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая).

2. Выяснить методы окраски волютин, гликогена, гранулёзы, включений жировой природы, описать методы, выполнить окраску фиксированных и прижизненных микропрепаратов по этим включениям, промикроскопировать и зарисовать.

3. Приготовить микропрепарат по обнаружению капсул в исследуемых культурах бактерий способом «негативной» окраски либо по методу Гинса, промикроскопировать и зарисовать.

4. Определить кислотоустойчивость клеток микроорганизмов по методу Циль–Нильсена, промикроскопировать с иммерсионной системой и зарисовать.

7 РЕЦЕПТЫ КРАСИТЕЛЕЙ И ИНДИКАТОРОВ

Метиленовый синий (по Леффлеру)

- насыщенный спиртовой раствор метиленового синего – 30 мл;
- вода дистиллированная – 100 мл;
- 1%-ный водный раствор КОН – 1 мл.

Приготовление красящих бумажек генцианвиолета (по Синеву)

Для приготовления бумажек фильтровальную бумагу предварительно испытывают на пригодность. Для этого полоску фильтровальной бумаги погружают в спиртовой раствор красителя (карболового генцианового фиолетового), высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно без пятен. Если небольшой кусок такой бумаги положить на стекло с несколькими каплями воды, он сразу же пропитается водой и краситель через несколько секунд перейдет в раствор. Бумагу для пропитывания нарезают полосками (шириной 2,0–2,5 см, длиной 30 см) и погружают в краситель так, чтобы смачивались обе поверхности. Затем полоски вынимают, высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 37 °С.

Пропитывать красящиеся бумажки можно также спиртовым раствором генцианвиолета следующего состава:

- генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г;
- спирт этиловый, 96° – 100 мл;
- глицерин – 5 мл.

Фуксин основной, водный (фуксин Пфейфера)

- карболовый фуксин Циля – 10 мл;
- дистиллированная вода – 90 мл.

Водный фуксин нестойк, его лучше готовить непосредственно перед употреблением. Раствор водного фуксина может храниться не более 10 дней.

Фуксин основной карболовый – фуксин Циля

- фуксин основной кристаллический – 1 г;
- карболовая кислота (фенол) – 5 г;
- этиловый спирт, 96° – 10 мл;
- дистиллированная вода – 100 мл.

При приготовлении раствора предварительно взвешивают определенное количество (1 г) фуксина основного кристаллического, вносят в фарфоровую ступку и растирают с определенным количеством (5 г) карболовой кислоты, добавляя спирт небольшими порциями и дистиллированную воду до полного растворения кристаллов, после

чего приливают оставшуюся воду. Приготовленный краситель ставят в термостат при 37 °С на двое суток. Затем отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной карболовый устойчив и может храниться долго. Хранить следует в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый можно приготовить другим способом:

Вначале готовят два раствора.

1-й раствор:

- фуксин основной кристаллический – 1 г;
- этиловый спирт, 96° – 10 мл.

Смесь растирают в фарфоровой ступке до полного растворения кристаллов фуксина.

2-й раствор:

- карболовая кислота – 5 г;
- дистиллированная вода – 95 мл.

Воду подогревают до 50 °С для лучшего растворения карболовой кислоты. Второй раствор вливают в первый, хорошо взбалтывают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Раствор Люголя (в модификации Грама)

В ступку вместимостью 30–50 мл помещают 1 г кристаллического йода и 2 г йодида калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды, продолжают растирать кристаллы и добавляют еще 5 мл воды. При этом йод растворяется в йодиде калия. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Раствор годен не более 30 дней, хранят его в прохладном месте, в темноте, лучше в посуде оранжевого цвета.

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулёзы

- кристаллический йод – 1 г;
- йодид калия – 3 г;
- вода дистиллированная – 300 мл.

Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Для обнаружения гликогена можно также использовать крепкий раствор йода:

- кристаллический йод – 7 г;
- йодид калия – 20 г;
- вода дистиллированная – 100 мл.

Сафранин (водный)

10 мл 2,5%-ного раствора сафранина в 96%-ном этаноле смешивается со 100 мл дистиллированной воды.

Раствор туши для выявления капсул

Смешивают 10 мл жидкой натуральной туши с 90 мл дистиллированной воды. Затем раствор центрифугируют 15–20 мин. Верхний слой переносят в пробирку и автоклавируют 30 мин (0,05 МПа, температура 110 °С). После автоклавирования раствор отстаивают две недели, после чего его можно использовать.

Метиленовый синий 1:40

1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают с 40 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)

3 г метиленового синего растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор выдерживают 2–3 дня, периодически взбалтывая, затем фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив.

Красители для выявления липидов

а) *Судан III* – 0,5 г; молочная кислота концентрированная (или 96%-ный этиловый спирт) – 100 мл.

б) *Судан черный В* – 0,3 г; спирт этиловый, 70%-ный горячий – 100 мл.

Раствор выдерживают в течение нескольких часов при температуре 60 °С в закупоренной склянке, затем охлаждают и фильтруют.

Кристаллический фиолетовый, водный раствор

– кристаллический фиолетовый – 20 мг;

– вода дистиллированная – 100 мл.

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Лаптев, С.В. Микробиология: учебное пособие / С.В. Лаптев [и др.]; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – 319 с.
2. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие / А.И. Нетрусов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
4. Еремина, И.А., Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие / И.А. Еремина, О.В. Кригер. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. – 112 с.
5. Воробьев, А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие / А.А. Воробьев [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

Дополнительная литература

6. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова [и др.]. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 131 с.
7. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
8. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
9. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена: учебник для вузов / К.А. Мудрецова-Висс [и др.]. – М.: Издательский Дом «Деловая литература», 2001. – 388 с.
10. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
11. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
12. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учебное пособие / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.

Учебное издание

Каменская Елена Петровна

**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И ЦИТОЛОГИИ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ
по курсам «Основы микробиологии», «Микробиология»,
«Общая биология и микробиология» для студентов
направлений подготовки 240700.62, 260100.62, 100800.62
всех форм обучения

Редактор Малыгина И.В.

Технический редактор Глядищева Е.Е.

Подписано в печать 25.09.2013. Формат 60×84 1/16

Усл. п. л. – 2,8. Уч. изд. л. – 3

Печать – ризография, множительно-копировальный
аппарат «RISO EZ300»

Тираж 50 экз. Заказ 2013-83

Издательство Алтайского государственного
технического университета

656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46

Оригинал-макет подготовлен ИИО БТИ АлтГТУ

Отпечатано в ИИО БТИ АлтГТУ

659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27