


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

---

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИПР

  
А.Ю. Дмитриев  
«29» июня 2015 г.

## **МОРФОЛОГИЯ ОСНОВНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ И СТРУКТУРА КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ. ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР И ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Методические указания к выполнению лабораторной работы  
по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология»  
и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

*Составители* **А.П. Асташкина, Е.В. Плотников**

Издательство  
Томского политехнического университета  
2015

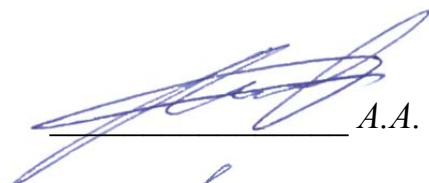
УДК 541.18(076.5)  
ББК 24.6я73  
М79

**М79 Морфология основных групп микроорганизмов и структуры клетки прокариот. Выявление клеточных структур и запасных веществ** : методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост.: А.П. Асташкина, Е.В. Плотников ; Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 23 с.

УДК 541.18(076.5)  
ББК 24.6я73

Методические указания рассмотрены и рекомендованы  
к изданию методическим семинаром кафедры  
физической и аналитической химии ИПР  
«29» июня 2015 г.

Зав. кафедрой ФАХ  
доктор химических наук,  
профессор

  
А.А. Бакибаев

Председатель  
учебно-методической комиссии

  
Н.В. Ушева

*Рецензент*

Кандидат химических наук,  
доцент кафедры ФАХ ИПР ТПУ  
*Е.В. Михеева*

© Составление. ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2015  
© Асташкина А.П., Плотников Е.В.,  
составление, 2015  
© Оформление. Издательство Томского  
политехнического университета, 2015

## План коллоквиума

### по теме «Морфология основных групп микроорганизмов и структуры клетки прокариот. Выявление клеточных структур и запасных веществ»

1. На какие три основные группы делят бактерии по их форме?
2. Назовите структурные основные компоненты клетки прокариот?
3. Назовите основные отличия прокариотической клетки от эукариотической.
4. Какие структурные элементы бактериальной клетки относят к временным?
5. Какие питательные вещества относятся к резервным, или запасным, в клетках прокариот?
6. Как окрасить нуклеоид в клетках дрожжей?
7. В чем сущность метода окраски запасных питательных веществ: волютина, гранулезы, гликогена, жировых веществ?

## Список литературы

1. Калганова Т.Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии : лабораторные работы / Т.Н. Калганова. – Южно-Сахалинск : СахГУ, 2011. – 56 с.
2. Нетрусов А.И. Общая микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – Москва : Академия, 2007. – 220 с.
3. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы: учеб. пособие. – СПб.: изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 147 с.
4. Асонов Н.Р. Микробиология / Н.Р. Асонов. – Москва : ВО Агропромиздат, 1989. – 230 с.
5. Аникеев В.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – Москва : Просвещение, 1983. – 128 с.

## Теоретическая часть

**Микроскопия** является одной из основных техник в микробиологическом исследовании [1,2]. Микроскопия подразделяется на несколько видов: световая (оптическая), электронная, рентгеновская и предназначена для наблюдения и регистрации увеличенных изображений образца. Основным видом микроскопии, используемым в бактериологической практике, является световая микроскопия и ее разновидности, ввиду простоты техники и доступности методики.

С помощью современного биологического микроскопа можно получить увеличение до 2500 раз и провести идентификацию объекта, рассмотрев его морфологические особенности. Современный световой микроскоп позволяет рассмотреть объекты величиной не менее 0,2–0,3 мкм. Поскольку живые микроорганизмы прозрачны и плохо видны в проходящем свете, то для детального изучения обычно используют фиксированные и окрашенные бактерии. Можно использовать также препараты живых бактерий, в каплю суспензии которых добавлен определенный краситель (метиленовый синий, генцианвиолет, йод и др.).

### 1. Световая микроскопия

В световой микроскопии лучи света от микрообъекта, проходя через систему собирающих линз – объектив и окуляр, дают в соответствии с законами оптики увеличенное изображение изучаемого образца. Пучок света, проходящий через исследуемый образец или отраженный от него, меняет одну или несколько характеристик (длину волны, интенсивность, фазу или плоскость поляризации), что сопровождается различными оптическими эффектами – поглощением, отражением, преломлением, дифракцией, интерференцией, дисперсией, люминесценцией и другими, которые в совокупности и составляют изображение.

В настоящее время световая микроскопия – это целый комплекс методов, использующих различные оптические эффекты.

#### Виды световой микроскопии

1. **Метод светлого поля** в проходящем свете применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами.

2. **Темнопольная микроскопия** (микроскопия в темном поле).

В данном методе используют специальный конденсор, который пропускает только краевые лучи источника света, косо направленные.

Препарат освещается сбоку косыми пучками лучей, не попадающими в объектив. В силу этого микробные клетки и другие частицы представляются ярко светящимися на черном фоне (картина напоминает мерцающее звездное небо). Для микроскопирования в темном поле на верхнюю поверхность конденсора наносят каплю иммерсионного масла, а на столик помещают предметное стекло с объектом (чтобы не появились пузырьки воздуха). На покровное стекло также наносят каплю масла. Таким образом, нанеся масло на обе поверхности препарата, достигают однородности среды для проходящих лучей света. Одинаковый коэффициент преломления обеспечивает четкость изображения объекта, а темное поле позволяет лучше рассмотреть мелкие детали клетки бактерий.

### ***3. Люминесцентная микроскопия***

Метод люминесцентной микроскопии основан на том, что объект, освещаемый коротковолновым светом (синим или УФ), способен к свечению. Причем если он содержит химические вещества, флюоресцирующие при действии на них коротковолнового света, имеет место первичная люминесценция. Обычно используют явление вторичной люминесценции, когда свечение объекта происходит после обработки его специальными красителями – флюорохромами. К ним относятся акридиновый желтый, оранжевый и т. д.

Главное преимущество метода состоит в том, что частицы многих веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ излучение определенных длин волн и, следовательно, легко различимы в УФ изображениях.

Для люминесцентной микроскопии используют обычный микроскоп с набором светофильтров и источником УФ. Первый фильтр – синий, пропускающий длинноволновую часть спектра, помещают перед источником света, а второй – в окуляр микроскопа, пропускающий только люминесцентное свечение препарата. Для приготовления препарата каплю жидкости с исследуемыми микроорганизмами смешивают с каплей раствора красителя и покрывают покровным стеклом.

### ***4. Иммерсионная световая микроскопия***

Иммерсионная световая микроскопия используются для изучения объектов невидимых или плохо видимых через сухие системы микроскопа. Для исследования микроорганизмов используют иммерсионные объективы (масляно-погруженные) с увеличением окуляра (x90), дающие увеличение от 600 до 1350 раз, в зависимости от используемого увеличения окуляра (7x, 8x, 9x, 10x, 15x.).

При работе с иммерсионным объективом его погружают в каплю кедрового или пихтового масла, нанесенного на препарат. Показатель преломления этого масла близок к показателю преломления стекла, и

между стеклом и линзой объектива устанавливается однородная среда. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не меняя своего направления, попадают в объектив и обеспечивают хорошую видимость микроорганизмов.

## **2. Основные приемы микроскопирования микроорганизмов**

Для микроскопирования микроорганизмов готовят живые и фиксированные препараты. Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2–1,4 мм. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15–0,17 мм. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу. Это достигается протиранием стекол ватой, смоченной спиртом либо эфиром (после этого промывание водой не требуется), или обжиганием поверхности стекол в пламени горелки (жир при этом сгорает).

### **2.1. Приготовление живых препаратов микроорганизмов**

Для определения формы микроорганизмов, их подвижности, физиологического состояния готовят препараты живых микроорганизмов и ведут прижизненное наблюдение. Существуют два основных способа приготовления живых препаратов микроорганизмов.

#### **2.1.1. Метод раздавленной капли**

В центр предметного стекла пипеткой наносят исследуемый материал – каплю суспензии с микроорганизмами. Если взвесь густая, то нужно предварительно разбавить ее дистиллированной водой. Покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее таким образом, чтобы между стеклами не оставалось пузырьков воздуха. Капля должна быть небольшой, чтобы после раздавливания жидкость не выступала за края покровного стекла, излишки жидкости следует убрать фильтровальной бумагой. Препарат из-за высыхания не может долго храниться. Изучать препарат в светлом и темном поле, использовать иммерсионный объектив.

#### **2.1.2. Метод висячей капли**

На чистое покровное стекло нанести каплю суспензии микробов, наложить на него предметное стекло с углублением, плотно прижимая, перевернуть их. Капля должна висеть на покровном стекле над углублением предметного стекла, то есть в закрытой камере. Висячую каплю рассматри-

вают, пользуясь зеркалом, диафрагму при этом суживают при малом и расширяют при большом увеличении. Метод дает возможность наблюдать микроорганизмы длительное время и следить за делением клеток.

При работе с живыми препаратами микроорганизмов для лучшего видения каплю суспензии можно слегка подкрасить слабым раствором йода, метиленовым синим или фуксином. Небольшие концентрации красителей не влияют на жизнедеятельность клеток, сохраняющих свою подвижность.

## **2.2. Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов**

Фиксированные препараты микроорганизмов используют для детального изучения строения клеток (ядро, включения, споры) и подсчета микроорганизмов. Процесс приготовления фиксированных препаратов складывается из приготовления мазка, высушивания препарата, его фиксации и окраски.

Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок. При таком распределении материала в мазке при микроскопии можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидком виде, то его непосредственно наносят петлей на предметное стекло. Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки, не давая капле закипать.

Для фиксации микроорганизмов, целью которой является убить микроорганизмы и закрепить их на стекле используются различные способы. Простейшим из них является фиксация пламенем. Для этого препарат медленно 3–4 раза проводят над верхней частью пламени горелки таким образом, чтобы сильно нагреть нижнюю поверхность стекла, чем и достигается фиксация. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла, и не смываются при дальнейшей обработке. Для фиксации микроорганизмов также широко применяют растворы различных химических веществ: этиловый спирт (96 % об.) в течение 5–20 мин; смесь равных объемов этилового спирта и эфира – 5 мин; метиловый спирт – 5 мин; смесь формалина (5 мл) со спиртом (95 мл) – 2 мин и др.

### 3. Определение количества клеток микроорганизмов в счетных камерах под микроскопом

Для подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом можно использовать счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема (как живых, так и мертвых). Основное ограничение большинства указанных методов – необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого образца.

Этот метод рекомендуется для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов, и других крупных бактерий. Для подсчета микроорганизмов используется камера Горяева-Тома (рис. 1–2).

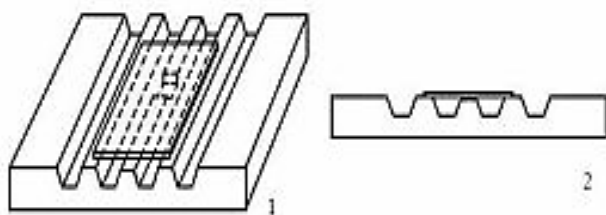


Рис. 1. Камера Горяева:  
1 – вид сверху; 2 – вид сбоку

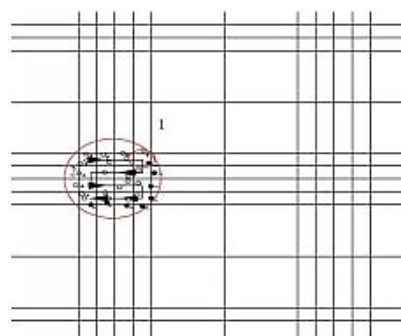


Рис. 2. Сетка Горяева:  
1 – маленький квадрат;  
2 – большой квадрат

Камера Горяева внешне представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры (0,1 мм) и площадь больших ( $1/25 \text{ мм}^2$ ) и малых ( $1/400 \text{ мм}^2$ ) квадратов сетки указаны на предметном стекле.

Число клеток подсчитывают с объективом 8x (10x). Подсчет клеток рекомендуется начинать через 2–3 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании находились в одной плоскости. Подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 малых квадратах сетки, двигаясь по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете число клеток в большом квадрате не должно быть больше 20, а в малом – 10; в противном случае суспензию разбавляют. Для получения достоверного результата число клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.



#### 4. Морфология и структурная организация бактериальной клетки

Бактерии составляют наиболее обширную и весьма разнообразную группу микроорганизмов. В классификации бактерий используют набор фенотипических признаков: морфологических, культуральных, физиологических и биохимических.

Описание морфологических признаков включает определение формы, размеров клеток и их взаимного расположения, типа жгутикования, наличия капсулы, способности образовывать споры, особенностей внутреннего строения. К категории морфологических признаков относится также окраска по методу Грама, связанная со строением клеточной стенки. Однако только морфологических признаков для идентификации бактерий недостаточно. Если, например, выделены подвижные грамотрицательные палочки, не образующие эндоспоры и имеющие длину 6 мкм, то определить их видовую принадлежность только на основании этого невозможно, ибо указанными признаками обладают бактерии многих видов.

При характеристике культуральных признаков, т. е. таких, которые проявляются при выращивании бактерий в различных условиях, отмечают особенности роста бактерий на плотной питательной среде (размер, окраска, форма, характер колоний) и в жидких питательных средах (образование осадка, пленки, взвеси, хлопьев и т. д.). Однако и этих признаков недостаточно, так как у культур различных видов они могут проявляться сходным образом.

К числу физиологических признаков относятся возможность использовать те или иные источники углерода и азота, потребность в факторах роста, тип энергетических процессов (аэробное и анаэробное дыхание, брожение), отношение к температуре, влажности, кислотности среды и другим факторам внешней среды.

Разнообразными являются биохимические признаки бактерий, которые обусловлены наличием тех или иных ферментов, образованием определенных продуктов метаболизма (кислоты, спирты, газы и др.), типом запасных веществ, химическим составом клеток и т. д.

В настоящее время отсутствует сколько-нибудь детализированная эволюционная система прокариот и, скорее всего, решение этой проблемы— дело недалекого будущего. Особенности прокариот в области морфологической, физиолого-биохимической, генетической организации говорят о неприменимости к ним хорошо разработанных принципов, используемых при построении системы высших организмов.

## 4.1. Морфология бактерий

По форме бактерии делят на три группы: шаровидные, палочковидные и извитые (рис. 3).



Рис. 3 Формы клеток прокариот

### 4.1.1. Шаровидные бактерии (кокки)

Систематическим признаком при делении родов шаровидных бактерий служат направление плоскости деления клетки и характер взаимного расположения клеток. Диаметр кокков – 0,5–1,2 мкм.

**Моно-, или микрококки** (род *Micrococcus*). Их клетки делятся в одной плоскости и сразу после деления располагаются одиночно.

**Диплококки** (род *Diplococcus*) и стрептококки (род *Streptococcus*) образуются при делении клеток в одной плоскости, у диплококков клетки располагаются попарно, у стрептококков – в цепочку.

**Тетракокки** (род *Tetracoccus*) возникают при делении клеток в двух взаимно-перпендикулярных плоскостях, клетки образуют группы по четыре особи.

**Сарцины** (род *Sarcina*) формируются при делении клеток в трех взаимно-перпендикулярных областях, при этом образуются пакеты из восьми-шестнадцати и более клеток.

**Стафилококки** (род *Staphylococcus*) представлены скоплением клеток, напоминающих виноградные гроздья. Деление клеток идет в нескольких плоскостях.

Помимо правильной шаровидной формы, кокки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки) или бобовидную форму кофейного зерна (гонококки, менингококки). Шаровидные бактерии не имеют жгутиков, неподвижны и споры не образуют. Исключение составляет мочевиная сарцина – *Sarcina ureae*.

#### 4.1.2. Палочковидные бактерии

Группа палочковидных бактерий является самой многочисленной и разнообразной. Палочковидные бактерии различают по величине клеток, их расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клеток палочковидных бактерий колеблется от 0,7 до 15 мкм, ширина – 0,5–1 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры. Большинство бактерий этой формы спор не образует и относится к роду *Bacterium* (обозначают *Bact.*, или *B.*). Те палочковидные бактерии, которые при неблагоприятных условиях способны формировать споры, принято называть бациллами (обозначают *Bacillus* – *Bac.*). Бактерии и бациллы могут располагаться одиночно, парно или соединяться в цепочки. В последнем случае они называются стрептобациллами, или стрептобактериями.

#### 4.1.3. Извитые бактерии

В зависимости от формы клетки и количества витков их делят на три вида клеток:

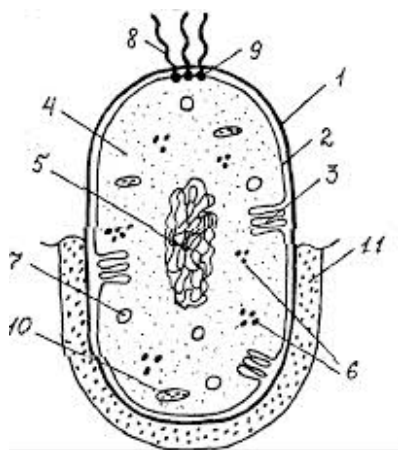
- вибрионы (род *Vibrio*) представлены короткими изогнутыми палочками в виде запятой. Клетки вибрионов изогнуты на 1/3 оборота;
- спириллы (род *Spirillum*) имеют вид латинской буквы *S*. Они значительно крупнее. Длина – 15–20 мкм, клетки имеют два-три витка;
- спирохеты (род *Spirochaetales* Bergey) – это очень тонкие длинные клетки, штопорообразные, с большим числом витков. Длина клетки превосходит ширину в 5–200 раз. По числу витков клетки одних видов отличаются от других.

С вибрионами и спириллами можно познакомиться на мазках, приготовленных из стоячей воды, представителей рода спирохет можно обнаружить в мазке из зубного налета (легко выделяются большая и малая зубная спирохеты (*Spirochaeta macro-* и *microdentata*)).

Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

## 4.2. Структурная организация прокариотической (бактериальной) клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рис. 4).



- 1 – клеточная стенка;
- 2 – цитоплазматическая мембрана;
- 3 – мезосомы;
- 4 – цитоплазма;
- 5 – нуклеоид;
- 6 – рибосомы;
- 7 – запасные вещества;
- 8 – жгутики;
- 9 – базальное тельце;
- 10 – тилокоиды;
- 11 – капсула

Рис. 4. Схема строения прокариотической клетки

Прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки и т. д. Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий и являются важным диагностическим признаком, который используется для идентификации бактерий.

Следует отметить, что особенностью клеточных стенок бактерий по сравнению с клетками эукариот является наличие в них особых структурных элементов:

- чередующихся последовательностей *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты;
- наличие мезо-диаминопимелиновой кислоты, *D*-форм аланина и глутаминовой кислоты.

Эти структурные элементы составляют ахиллесову пяту бактерий, используемую врачами в борьбе с инфекцией. Для борьбы с инфекцией бактериальной этиологии применяют лекарственные препараты, специфически воздействующие только на клеточные стенки бактерий или на процесс их синтеза, но не на клетки растений, животных и человека.

Среди структурных компонентов прокариот различают как основные, так и временные.

#### **4.2.1. Основные структурные компоненты прокариот:**

- клеточная стенка, имеющая различное строение у грамположительных и грамотрицательных бактерий;
- цитоплазматическая мембрана с включениями (мезосомы, хроматофоры);
- цитоплазма – гомогенная белково-коллоидная фракция с растворенными в ней компонентами (белками, ферментами, продуктами обменных реакций);
- нуклеоид – ядерное вещество прокариот, представленное молекулой ДНК в виде длинной нити, перекрученной и замкнутой в кольцо, собственно ядерная мембрана отсутствует;
- плазмиды – внехромосомные генетические элементы, имеющие свои небольшие кольцевые молекулы ДНК;
- прочие постоянные включения цитоплазмы – органеллы: рибосомы, хлоросомы, аэросомы, фикобилисомы, карбоксисомы.

#### **4.2.2. Временные структурные компоненты прокариот:**

- жгутики, возникающие на определенной стадии жизненного цикла и служащие для передвижения бактерий;
- фимбрии, выполняющие функции взаимодействия с другими клетками бактерий (при конъюгации) или с субстратом;
- капсула, или слизистый защитный матрикс, окружающий клетку прокариот снаружи;
- запасные питательные вещества в виде включений – отложений их в цитоплазме (волютин, гликоген, гранулеза, жиры, зерна аморфного карбоната кальция и др.).

Все виды включений бактериальной клетки можно выявить при помощи специальных цитохимических методов окраски.

Зерна волютина округлой формы диаметром 0,5 мкм. В них входит комплекс неорганических полифосфатов и РНК, где содержится запас азота и фосфора в клетке. Они служат источником потенциальной энергии и расходуются при голодании бактерий. Волютиновые зерна фиолетово-красного цвета, выражены хорошо при окраске метиленовым синим в клетках дрожжей, молочнокислых и ряда патогенных бактерий.

Гликоген (животный крахмал) и гранулеза (крахмалоподобное вещество) относятся к резервным питательным веществам углеводной природы. Гликоген легко выделяется при окраске йодом в клетках дрожжей и аэробных бацилл (гранулы буро-красного цвета). Гранулеза характерна для анаэробных споровых бактерий рода *Clostridium* (гранулы темно-синего цвета). Гликоген и гранулеза являются энергетическим запасом клетки и расходуются при ее голодании.

Жиры в клетках бактерий видны в виде мелких капель, неравномерно распределенных в цитоплазме. Жировые включения накапливаются при обильном питании клеток безазотистыми веществами или являются результатом жирового перерождения цитоплазмы при старении культуры. Их легко можно выявить в клетках дрожжей и аэробных бацилл.

У серных бактерий встречаются включения молекулярной серы, также служащей для них источником энергии. В процессе жизнедеятельности у ряда бактерий происходит накопление зерен аморфного карбоната кальция, кристаллов щавелевой и других кислот, гранул или кристаллов белка.

## 5. Окраска бактерий по Граму

В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные. Существует метод окраски, позволяющий разделить бактерии на эти две группы. Он был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. Метод основан на способности некоторых форм бактерий образовывать в клетке прочное соединение основных красителей – генцианвиолета и йода, которое не обесцвечивается при последующей обработке спиртом, в результате чего эти бактерии сохраняют сине-фиолетовую окраску и называются грамположительными – грам(+). Другие бактерии не обладают свойством удерживать окраску и при работе спиртом обесцвечиваются, приобретая красную окраску – грам(-). Отношение к окраске по Граму служит одним из основных признаков бактерии в ее характеристике. Окраска по Граму связана также с возрастными особенностями культуры: лучше красятся бактерии в молодых двух-, трехдневных культурах.

Способность бактериальных клеток окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий. У грам(+) бактерий клеточная стенка на 50–90 % состоит из муреина (пептидогликана) и тейхоевой кислоты, полимера, образованного остатками глицерина, связанными фосфодиэфирными мостиками. К грамположительным бактериям относятся следующие: *Bacillus subtilis*, *Sarcina ventriculi*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus* и др.

Клеточная стенка Грам(-) бактерий значительно тоньше, чем у Грам(+), но имеет двухслойную структуру. Наружный слой состоит из липопротеидов и липополисахаридов, которые препятствуют проникновению токсических веществ. Поэтому Грам(-) бактерии более устойчивы к действию антибиотиков и ядовитых химических веществ. Одной из отличительных особенностей грам(-) бактерий является отсутствие в их клеточной стенке тейхоевых кислот. К грамотрицательным бактериям относятся *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.

## Экспериментальная часть

**Цель:** знакомство с морфологией бактерий и способами окрашивания различных включений и структур клетки прокариот.

### План работы:

1. Познакомиться с морфологией основных групп микроорганизмов;
2. Подготовить фиксированные препараты для окраски и выявления клеточных структур и запасных веществ в прокариотических клетках.
3. Провести окраску препаратов для определения нуклеотида, волютина, гликогена, включений жировой природы, окраска по Граму.
4. Рассмотреть препараты с иммерсией и зарисовать.
5. Определить количество живых и мертвых клеток в препарате.

**Материалы и оборудование:** покровные стекла, предметные стекла, спиртовка, этиловый спирт (96%), микробиологические пели, стерильные пипетки, дистиллированная вода, фильтровальная бумага; световой микроскоп, серологическая пипетка на  $1\text{ см}^3$ , 10%-формалин.

Красители: фуксин, метиленовый синий, раствор Люголя, генциан-виолет, Судан III.

**Объект исследования:** суспензия пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1. Приготовление суспензии дрожжей

Навеску пекарских дрожжей 0,3 г разводят в  $30\text{ см}^3$  стерильной дистиллированной воды. К дрожжевой суспензии вносят  $2\text{ см}^3$  глюкозы. Через 10–15 мин можно использовать приготовленную суспензию.

### 2. Приготовление препарата живых клеток микроорганизмов

На предметное стекло серологической пипеткой  $1\text{ см}^3$  наносят каплю приготовленной суспензии дрожжевых клеток и накрывают покровным стеклом. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой. Препарат микроскопируют при увеличении 40х.

### 3. Приготовление фиксированных препаратов

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла серологической пипеткой  $1\text{ см}^3$  наносят каплю суспензии дрожжей.
2. Этой же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределяют суспензию на  $1/5$  центральной части поверхности предметного стекла.
3. Высушивают мазок на воздухе или высоко над пламенем спиртовки.
4. Зафиксируют мазок сухим жаром (термическая фиксация): закрепив предметное стекло пинцетом мазком вверх, проводят его сквозь пламя спиртовки плавными круговыми движениями 3–5 раз. При этом микроорганизмы убиваются и прочно прикрепляются к стеклу.

### 4. Окраска бактерий по Граму

1. На фиксированный мазок наносят с помощью пипетки каплю карболово-спиртового раствора генцианового фиолетового, накрывают полоской фильтровальной бумаги. Через 1-2 мин снимают ее, а краситель смывают.
2. Наносят раствор Люголя на 2 мин.
3. Обесцвечивают препарат 95-% этиловым спиртом в течении 30–60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
4. Промыть препарат водой.
5. Проводят докрасивание препарата фуксином на 1–2 мин, промывают водой, подсушивают навоздухе.
6. Рассматривают с иммерсией и зарисовывают (прил. 1). Делают вывод о принадлежности дрожжей к грам(+) и грам(-).

### 5. Определение нуклеоида в клетках дрожжей

1. На фиксированный мазок наносят каплю красителя Судана III через полоску фильтровальной бумаги. Через 3 мин убирают фильтровальную бумагу, а краситель смывают водой. Препарат высушивают на воздухе.
2. Погружают предметное стекло в стакан с  $50\text{ см}^3$  1н HCl, предварительно подогретой до  $60^\circ\text{C}$ , на 2–3 мин. После проведения гидролиза, мазок тщательно промывают водой.
3. К мазку добавляют раствор 1%-формалина на 2 мин, затем промывают водой.
4. Окрашивают мазок раствором 1%-фуксина в течение 1–2 мин, промывают водой, высушивают на воздухе.



5. Микроскопируют с иммерсионным объективом. На розовом фоне цитоплазмы должны выделяться нуклеотиды, ярко-малинового цвета. Зарисовывают получившуюся картинку (приложение 1).

#### **6. Определение волютина дрожжей по методу Омелянского**

1. На фиксированный мазок наносят каплю фуксина через полоску фильтровальной бумаги. Через 1 мин убирают фильтровальную бумагу, а краситель смывают водой. Препарат высушивают на воздухе.

2. Добавляют на мазок одну каплю 1 %  $H_2SO_4$ . Через 30 с смывают водой.

3. Наносят каплю метиленового синего на мазок, через 1 мин промывают водой, высушивают на воздухе.

4. Рассматривают с иммерсией и зарисовывают получившуюся картину (прил. 2). На голубом фоне цитоплазмы должны быть видны красные зерна волютина.

#### **7. Определение волютина по методу Леффлера**

1. Тонкий фиксированный мазок культуры микроорганизмов (дрожжей) окрашивают через полоску фильтровальной бумаги метиленовым синим Леффлера. Через 3 мин снимают фильтровальную бумагу, а краситель смывают водой.

2. Не высушивая мазок добавляют каплю 1 % серной кислоты и накрывают покровным стеклом.

3. Микроскопируют при увеличении 40х. Зерна волютина на препарате должны быть окрашены в красновато-фиолетовый цвет, а цитоплазма – бесцветной. Зарисовывают получившуюся картину (прил. 2).

#### **8. Определение гликогена**

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой наносят каплю суспензии дрожжей.

2. Этой же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределяют суспензию на 1/5 центральной части поверхности предметного стекла.

3. Для фиксации мазка на предметное стекло наносят каплю смеси Никифорова и выдерживают в течение 5 мин.

4. На фиксированный мазок наносят каплю концентрированного раствора Люголя и выдерживают в течение 30 с. Промывают водой и накрывают покровным стеклом.

5. Микроскопируют при увеличении 40х. Гранулы гликогена окрашиваются в красновато-бурый цвет. Зарисовывают получившуюся картину (прил. 3).

## 9. Определение включений жировой природы

Жировые включения в клетках некоторых дрожжей можно видеть и без специальных методов окраски, пользуясь прижизненным микропрепаратом. В клетках дрожжей можно видеть крупные капли жира, сильно преломляющие свет.

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой наносят каплю суспензии дрожжей.

2. Этой же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределяют суспензию на 1/3 центральной части поверхности предметного стекла.

3. Для фиксации мазок к капле дрожжевой суспензии на предметное стекло наносят каплю 40%-й формалина и выдерживают в течение 5 мин.

4. На фиксированный мазок через полоску фильтровальной бумаги наносят каплю метиленового синего. Через 10 мин убирают фильтровальную бумагу, а краситель смывают водой.

5. Окрашивают мазок раствором Судана III и накрывают покровным стеклом.

6. Микроскопируют при увеличении 40х. Жировые включения окрашиваются в красно-оранжевый цвет, цитоплазма – в синий. Зарисовывают получившуюся картину (прил. 3).

## 10. Определение жизнеспособности дрожжей с помощью камеры Горяева

1. На счетную камеру Горяева серологической пипеткой  $1 \text{ см}^3$  наносят небольшое количество приготовленной суспензии дрожжевых клеток.

2. Окрашивают препарат метиленовым синим.

3. Накрывают камеру покровным стеклом, слегка прижимая, двигают в стороны до появления картины интерференции (колец Ньютона).

4. Через 2–3 мин. после заполнения помещают камеру на столик микроскопа для микроскопирования с объективом 8 х.

5. Подсчитывают количество мертвых (окрашенных) и живых клеток. Подсчет клеток повторяют 3 раза, каждый раз заново монтируя и заполняя камеру.

Подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших квадратах сетки, двигаясь по диагонали, и заполняют таблицу 1. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата.

Таблица 1

Количество клеток в 10 больших квадратах сетки ( $n = 3$ )

Квадраты	Количество живых клеток в квадрате сетки			Количество мертвых клеток в квадрате сетки		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

6. Рассчитывают среднее арифметическое значение живых клеток в 10 квадратах и определяют число клеток в 1 мл.

Число клеток в 1 мл вычисляют по формуле:

$$M = \bar{a} \cdot 2,5 \cdot 10^{-5}$$

где  $M$  – число клеток в 1 мл суспензии;  $\bar{a}$  – среднее количество живых клеток в квадрате сетки.

7. Рассчитывают жизнеспособность клеток по формуле:

$$\omega = \frac{\bar{a}_{\text{мертвых}}}{\bar{a}_{\text{живых}}} \cdot 100, (\%)$$

Величина жизнеспособности дрожжей в препарате не должна превышать 7 %, в противном случае, препарат дрожжей считается некачественными.

В отчете делают вывод о качестве дрожжей.

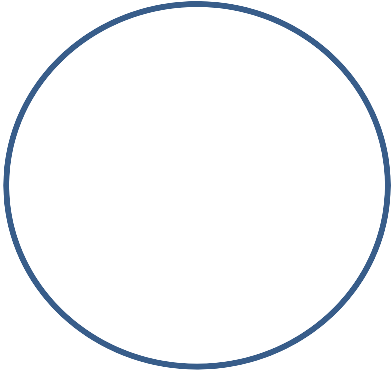
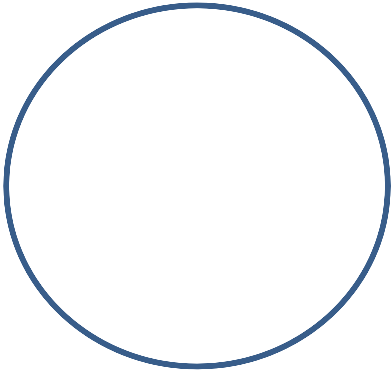
## 11. Требования к оформлению отчета

Отчет по лабораторной работе должен включать в себя:

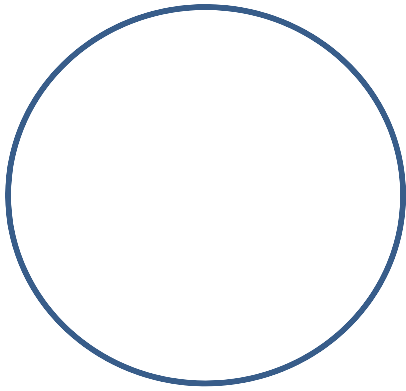
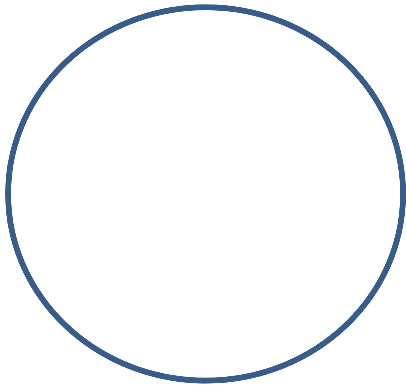
- 1) Титульный лист;
- 2) Цели выполнения лабораторной работы;
- 3) Основную часть (краткая характеристика объекта исследований; методика, результаты наблюдений и расчетов, представленные в форме таблиц, рисунков.

- 4) Обсуждение результатов выполнения лабораторной работы в виде кратких, но принципиально необходимых доказательств, обоснований, разъяснений, анализов, оценок, обобщений и выводов.

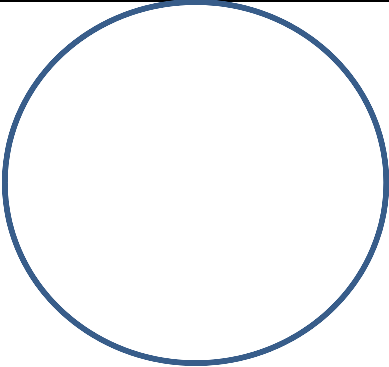
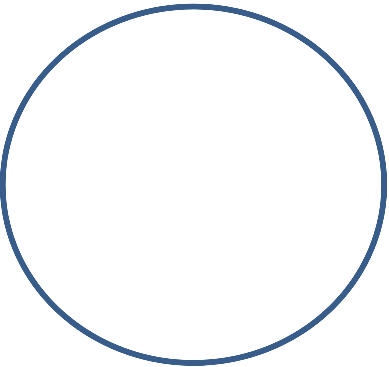
Приложение 1

 <p><i>Рис. 1. Окраска по Граму</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>
 <p><i>Рис. 2. Окраска нуклеоида в клетках дрожжей</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>

Приложение 2

 <p><i>Рис. 3. Окраска волютина в дрожжевой клетке по методу Леффлера</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>
 <p><i>Рис. 4. Окраска волютина в дрожжевой клетке по методу Омелянского</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>

Приложение 3

 <p><i>Рис. 5. Окраска гликогена в дрожжевой клетке</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>
 <p><i>Рис. 6. Окраска включений жировой природы в дрожжевой клетке</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>

Учебное издание

# МОРФОЛОГИЯ ОСНОВНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ И СТРУКТУРА КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ. ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР И ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ

Методические указания к выполнению лабораторной работы  
по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология»  
и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

*Составители*

АСТАШКИНА Анна Павловна  
ПЛОТНИКОВ Евгений Владимирович

**Издано в авторской редакции**


Компьютерная верстка *Д.В. Сотникова*

Подписано к печати 12.10.2015. Формат 60х84/16. Бумага «Снегурочка».  
Печать XEROX. Усл. печ. л. 1,34. Уч.-изд. л. 1,21.  
Заказ 408-15. Тираж 100 экз.



Национальный исследовательский Томский политехнический университет  
Система менеджмента качества  
Издательства Томского политехнического университета  
Сертифицирована в соответствии с требованиями ISO 9001:2008



**ИЗДАТЕЛЬСТВО**  **ТПУ**. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30  
Тел./факс: 8(3822)56-35-35, [www.tpu.ru](http://www.tpu.ru)