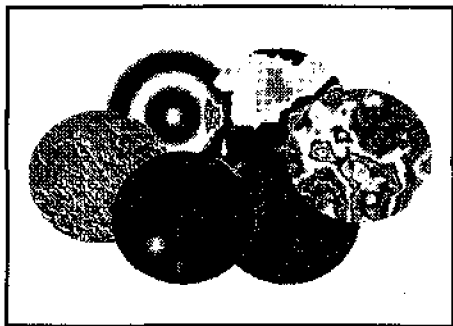


ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Часть 1



**ТЕХНИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

САМАРА
1997

Практикум отражает круг вопросов, предусмотренных программой изучения дисциплины "Микробиология и вирусология" на биологическом факультете университета. Доступное изложение теоретического материала и детальные пояснения к выполнению лабораторных занятий позволяют студентам ознакомиться с микробиологической лабораторией, освоить необходимые приемы и методы работы с культурами микроорганизмов.

Практикум предназначен для студентов биологических факультетов университетов и биологов, желающих освоить микробиологические приемы и методы исследования.

Составитель ст. преподаватель Н.А.Трещанина

Ответственный редактор канд. биол. наук, доц. Ю.П.Фролов

Рецензент доктор биол. наук, профессор М.М.Серых

ПРЕДИСЛОВИЕ

Университетская учебная программа курса "Микробиология и вирусология" предполагает большую самостоятельную работу студентов (почти половина отведенного на этот курс времени), поэтому часть теоретических разделов, необходимых для понимания и выполнения практических работ, предлагается студентам для самостоятельного освоения.

Практические занятия являются своеобразной и самостоятельной организационной формой обучения в университетах и ориентированы на малую учебную группу (10-12чел.), поэтому каждое практическое занятие со студентами преследует две цели, а именно: освоение микробиологических методов с обязательной выработкой какого-то практического навыка и закрепление знаний по основным вопросам учебной программы.

Поскольку студенты подготавливаются к занятиям, в основном, в процессе самостоятельной работы с учебниками и учебными пособиями во внеурочное время, то в систему закрепления знаний во время практических занятий входят такие элементы, как контрольный и программированный опрос.

Настоящий практикум включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен описанию приемов работы с чистыми культурами микроорганизмов, техники микроскопирования препаратов, принципам составления питательных сред и способам стерилизации. Данный раздел позволит студентам освоить основные приемы работы с микроорганизмами и ознакомиться с морфологией эукариотических и прокариотических клеток. Второй раздел посвящен описанию метода выделения чистых культур микроорганизмов по методу Коха и их идентификации по методу Грама. Третий раздел посвящен описанию методов изучения некоторых морфологических и биохимических признаков прокариот, которые позволят студентам дополнительно изучить и идентифицировать выделенные штаммы.

Описанию практических работ предшествует краткое теоретическое вступление, необходимое для понимания студентами сущности изучаемых вопросов, а также перечень оборудования, реактивов и материалов, необходимых для выполнения этих работ. Замечания по технике безопасности даются по ходу изложения конкретных работ.

Настоящий практикум предназначен в качестве дополнения к стандартным учебникам и студенческим конспектам лекций, используемым при изучении данного предмета. Он составлен в соответствии с программой курса "Микробиология и вирусология" для студентов университетов специальности "Биология" и отражает методику преподавания данной дисциплины в Самарском государственном университете.

Занятие № 1

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ.
МИКРОСКОПИРОВАНИЕ. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА.
ОСВЕЩЕНИЕ ПРЕПАРАТА ПО КЁЛЕРУ**

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ. Ознакомиться с оснащением и приемами дезинфекции микробиологической лаборатории. Ознакомиться с устройством светопольного микроскопа и овладеть методами работы с ним.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

Микробиолог имеет дело преимущественно с чистыми культурами микроорганизмов, которые представляют собой потомство одной клетки. Поскольку в воздухе и на поверхности предметов (на столах, приборах, инструментах), а также на одежде, волосах, руках и т. д. всегда присутствует большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Для этого питательные среды, посуду, инструменты и приборы стерилизуют, лабораторию и рабочие места содержат в чистоте и периодически подвергают специальной обработке, а при работе в лаборатории строго соблюдают определенные правила.

Микробиологическую лабораторию содержат в чистоте и ежедневно проводят гигиеническую уборку помещения. Для уничтожения микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях применяют различные способы дезинфекции.

Дезинфекция воздуха в лаборатории наиболее просто производится проветриванием. Продолжительность проветривания должна быть не менее 30-60 мин. Вентиляция резко снижает количество микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице температур снаружи и внутри помещения.

Другим, более эффективным и часто применяемым способом очистки воздуха является облучение ультрафиолетовыми лучами (УФ-лучи). К ультрафиолетовой области спектра относится излучение с длиной волны до 400 нм. Они обладают высоким антимикробным действием и вызывают гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. Однако из-за слабой проникающей способности УФ-лучи не проходят через обычное стекло и легко поглощаются частицами пыли. Кроме того, некоторые материалы, например белая бумага, пластины из полированного алюминия или хрома, заметно отражают УФ-лучи, тем самым препятствуя уничтожению микроорганизмов. Поэтому для стерили-

лизации требуется облучение от 30 мин. до нескольких часов, в зависимости от степени загрязненности воздуха.

Следует учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается. В этих случаях облучение целесообразно осуществлять с перерывами.

Бактерицидные лампы представляют собой трубки различного диаметра и длины, изготовленные из специального стекла, пропускающего практически всё излучение с длиной волны 253,7нм и задерживающего с длиной волны короче 200нм. Каждая трубка вмонтирована в корпус-держатель и может быть снабжена отражателем. Конструктивное оформление корпуса бывает различным.

ВНИМАНИЕ ! Техника безопасности. *Следует помнить, что УФ-лучи вызывают острое воспаление роговицы глаз с характерным слезотечением и светобоязнью, наступающее вскоре после облучения* Поэтому необходимо применять защитные очки и следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные УФ-лучи не попадали в глаза. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя.*

Пол, стены и мебель в лаборатории обрабатывают пылесосом и протирают растворами различных дезинфицирующих веществ. Обработка пылесосом освобождает предметы от пыли и удаляет значительную часть микрофлоры. Установлено, что 4-кратное проведение щеткой пылесоса по поверхности предмета удаляет с него около 47% микрофлоры, а 12-кратное - до 97%. В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего используют 2-3%-ный раствор соды (бикарбонат натрия), 3-5%-ный раствор фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5-3%-ный водный раствор хлорамина и некоторые другие дезинфектанты.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. *Причем рабочий стол необходимо дезинфицировать не только до начала работы, но после ее окончания.* Для этого используют растворы, указанные выше, а также 70%-ный (по объему) раствор изопропилового или этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов и могут использоваться также для дезинфекции рук. Если поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. Поверхность стола можно дезинфицировать и УФ-лучами. При этом нужно учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

На рабочем столе не должно быть лишних предметов. Все реактивы и растворы должны иметь этикетки и стоять на определенных местах.

Ряд работ с культурами микроорганизмов: пересевы чистых культур, количественный учет микроорганизмов в различных субстратах и другие - лучше всего осуществлять в специальном помещении - боксе.

Бокс представляет собой небольшую изолированную комнату, разделенную перегородкой на две части. Вход в рабочее помещение бокса осуществляется через тамбур с раздвижной дверью, что исключает резкое перемещение воздуха и занесение извне посторонней микрофлоры. Оборудование бокса состоит из стола с легко моющейся поверхностью, стула, газовой горелки и бактерицидной лампы, укрепленной в специальном штативе или смонтированной на потолке бокса. Удобно иметь в боксе подсобный стол, на котором размещают необходимые во время работы предметы. Все оборудование бокса, его стены, пол и потолок периодически моют и протирают дезинфицирующими растворами. Перед работой бокс облучают в течение 40-60 мин. УФ-лучами.

ВНИМАНИЕ ! Техника безопасности. РАБОТАТЬ В ЛАБОРАТОРИИ СЛЕДУЕТ ТОЛЬКО В ХАЛАТАХ, А ЕСЛИ ЖЕЛАЕТЕ СОХРАНИТЬ МОЛОДОСТЬ И ЗДОРОВЬЕ, В ЛАБОРАТОРИИ НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ, КУРИТЬ, ЕСТЬ, ПИТЬ И ХРАНИТЬ ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ.

СВЕТЛОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Микроскопы и использование эффективных методов микроскопии определяют основы микробиологии как одного из разделов биологической науки. Бактериология, в частности описательная, вобрала все достигнутое в области совершенствования микроскопических методов как простых, так и сложных, потому что вездесущие прокариотические организмы, с которыми она имеет дело, представляют собой действительно маленькие клетки, величина которых измеряется микронами ($1\text{мкм}=0,001\text{мм}$).

МИКРОСКОП (от *микро...* и греч. *skoped* - смотрю) - это *оптический прибор для получения сильно увеличенных изображений объектов (или деталей их структуры), не видимых невооруженным глазом*. При этом изображение исследуемых объектов увеличивается в сотни (световые микроскопы) и десятки тысяч (электронный микроскоп) раз.

Световой микроскоп доступен и необходим всем микробиологам, но поскольку его эффективное использование достигается не так уж часто, существуют знания, которые необходимы каждому, кто желает получить информацию о детальной структуре или для идентификации бактерий.

Микроскопические исследования проводить легко и интересно, а их результаты отличаются четкостью, когда под рукой имеются микроскопы, постоянно готовые к работе и содержащиеся в порядке. Применение плохо настроенных микроскопов с плохим освещением настолько широко распространено, что лишь немногие биологи представляют себе возможности этого прибора. Иногда исследователи приходят в изумле-

ние, когда им удастся получить очень большое разрешение даже на студенческом микроскопе. Следует помнить, что многое можно сделать на очень простом оборудовании, причем умение приходит только с опытом, который ничем не заменишь. Поэтому прежде чем приступить к работе на микроскопе, следует ознакомиться с его устройством.

Светопольные микроскопы позволяют исследовать объекты в проходящем свете. Наиболее распространены биологические микроскопы типа МБИ-1, МБР-1, МБР-1А, С-11.

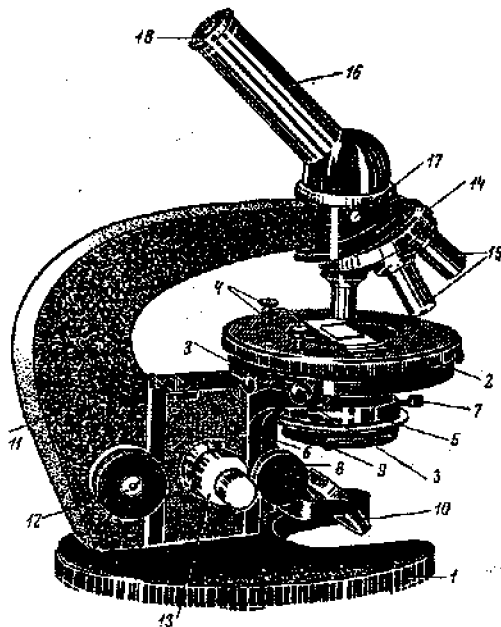


Рис. 1. Микроскоп МБР-1:

1 - подковообразное основание микроскопа; 2 - предметный столик; 3 - винты для перемещения предметного столика; 4 - клеммы, прижимающие препарат; 5 - конденсор; 6 - кронштейн конденсора; 7 - винт, укрепляющий конденсор в гильзе; 8 - рукоятка перемещения конденсора; 9 - рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10 - зеркало; 11 - тубусодержатель; 12 - рукоятка макрометрического винта; 13 - рукоятка микрометрического винта; 14 - револьвер; 15 - объективы; 16 - наклонный тубус; 17 - винт для крепления тубуса; 18 - окуляр.

Устройство микроскопа МЕР-1

Микроскоп имеет механическую и оптическую части.

Механическая часть служит для поддержания и укрепления оптической части и включает *штатив, предметный столик с клеммами, тубус, револьвер, макро - и микровинты*

В *штативе* различают ножку, или башмак подковообразной формы, и тубусодержатель, за который микроскоп держат при переносе. Тубусодержатель имеет форму дуги и может перемещаться на 50мм с помощью *микрометрического* и *микрометрического* винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. Макро метрический винт еще называют кремальерой, зубчаткой, макровинтом, а микрометрический винт - микровинтом. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. Один оборот микрометрического винта соответствует перемещению тубуса на 0,1мм, поэтому работать с ним необходимо особенно плавно.

В верхней части тубусодержателя находится вращающийся вокруг своей оси *револьвер* с 3-4 гнездами, в которые ввинчиваются объективы, и с гнездом для крепления наклонного или прямого *тубуса*. Поворотом револьвера вокруг оси под тубус подводится тот или иной объектив, и *при установке объектива на оптическую ось ощущается щелчок*. Наклонный тубус можно повернуть вокруг вертикальной оси в любое удобное положение и закрепить винтом. Внутри наклонного тубуса, в нижней его части, помещена призма, в верхний конец вставляется окуляр.

Предметный столик может перемещаться в горизонтальной плоскости на 1мм с помощью двух винтов, находящихся справа и слева. Столик может вращаться и вокруг своей оси. Это дает возможность привести любую точку препарата в центр поля зрения (у микроскопа С-11 предметный столик неподвижен). На поверхности столика имеются *две клеммы* - пружинящие металлические пластинки, зажимающие препарат.

Оптическая часть состоит из *осветительного аппарата, объектива и окуляра*.

Осветительный аппарат состоит из *зеркала* (или подсветки) и *конденсора*. Он является существенной частью оптической системы микроскопа.

Зеркало укреплено у основания штатива и имеет две стороны: вогнутую и плоскую. Вогнутое зеркало собирает и концентрирует в плоскости препарата пучок параллельных лучей, идущих от источника света, им пользуются только в тех случаях, когда работают без конденсора, т.е. с очень малыми увеличениями. *При работе с конденсором следует пользоваться только плоской стороной зеркала**

Конденсор (лат. *condenco* - уплотняю, сгущаю), укрепленный непосредственно над зеркалом, состоит из 2-3 короткофокусных линз. Конденсор концентрирует параллельные лучи света, идущие от плоского зеркала, и направляет их под большим углом на рассматриваемый объект. **Под конденсором имеются ирисовая (апертурная) диафрагма и откидная оправа** для светофильтра. Ирисовая (лепестковая) диафрагма состоит из тонких непрозрачных серповидных пластинок и служит для задержания излишних лучей света, что позволяет при необходимости уменьшать апертуру (см. ниже) конденсора.

Объектив (лат. *objectum* - предмет) - наиболее важная часть микроскопа, определяющая его оптическую мощь. Назначение объектива - давать действительное, увеличенное и обратное изображение предмета, которое в дальнейшем увеличивается ещё окуляром. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Самая главная - наружная (*фронтальная*) линза, от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива. *Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива.* **Увеличение** объектива в 8, 40 или 90 раз обозначено на металлической оправе. От увеличения объектива зависят ещё две его характеристики - рабочее расстояние, т.е. расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата при сфокусированном объекте, и площадь поля зрения. *Чем большее увеличение объектива, тем меньше его рабочее расстояние и поле зрения.* Это обстоятельство необходимо учитывать в практической работе: *чем большее увеличение дает объектив, тем ниже следует опускать его над плоскостью препарата.*

Как и всяким другим линзам, линзам объективов свойственны дефекты *сферической* и *хроматической* аберрации. Причина сферической аберрации связана со свойством линз неравномерно преломлять периферические и центральные лучи. Первые обычно преломляются в большей степени, чем вторые, и поэтому пересекаются на более близком расстоянии к линзе. При этом изображение точки распределяется в пространстве между местами пересечения краевых и центральных лучей и приобретает **вид расплывчатого пятна, т.е. каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, и изображение получается не резким, а размытым.** **Явление** хроматической аберрации возникает при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны. Преломляясь по-разному, лучи пересекаются не в одной точке. Сине-фиолетовые лучи с короткой длиной волны преломляются сильнее, чем красные с большей длиной волны. Вследствие этого *получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект.*

Для устранения дефектов получаемой картины выше фронтальной линзы в объективе расположены *коррекционные* (исправляющие). Они имеют различную кривизну поверхности и изготовлены из стекол разных

оптических свойств. *Эти линзы предназначены не для увеличения, а для получения более четкого изображения.* Поэтому, по способности устранять aberrации, объективы делятся на *ахроматы, апохроматы и планахроматы.*

Ахроматы содержат до шести линз и устраняют практически полностью дефект сферической и частично хроматической aberrации. Получаемое с их помощью изображение бесцветно, но края имеют как бы красный или синеватый ореол. В современных ахроматах этот недостаток минимален и практически неуловим. Они дают наиболее резкое изображение в центре, а края поля зрения часто бывают окрашены в разные цвета спектра. *Ахроматы широко распространены вследствие своей простоты и дешевизны.* Микроскоп МБР-1 и С-11 снабжены ахроматическими объективами.

Более совершенные объективы - апохроматы - могут состоять из 10, а иногда из 12 линз. Хроматическая погрешность в них почти в десять раз меньше, чем у ахроматов. Кроме того, в них достигнута более равномерная резкость изображения от лучей разного цвета. Это более дорогие объективы. На их оправе имеется обозначение "АПОХР". Планахроматы - разновидность апохроматов с плоским полем зрения. Они полностью устраняют искривление поля зрения, вплоть до краев. *Максимальный эффект при работе с апохроматами и планахроматами достигается при одновременном использовании компенсационных окуляров. Эти объективы целесообразно применять при микрофотографировании.*

Окуляр (лат. *oculus* - глаз) является как бы непосредственным продолжением "линз" человеческого глаза. Он содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирательную (нижнюю). Назначение нижней линзы - собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы. Глазная линза напоминает простой лупы увеличивает действительное изображение, даваемое объективом. Назначение окуляра состоит в прямом мнимом увеличении того действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив.

Общее увеличение окуляра повышается с уменьшением фокусного расстояния его линз, поэтому *более сильные окуляры будут короткими, а более слабые - длинными.* Окуляры могут давать увеличения в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе (например, 15х). Специальные, так называемые компенсационные, окуляры употребляются только с апохроматами и имеют обозначение "КОМП".

Увеличение и разрешающая способность

Объектив и окуляр дают изображение объекта, увеличенное в той или иной степени, которое определяется произведением увеличения обь-

ектива на увеличение окуляра. Так, например, используя окуляр 15х и объектив 90х, можно получить увеличение изображения в 1350 раз. Теоретически микроскоп может дать увеличение в 2000х и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличение микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400х. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений. Бесполезные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения. Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким.

Свойство микроскопа раскрывать тайны микромира, делать видимым тончайшие детали структур, называется *разрешающей способностью* микроскопа. Под последней понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Эта характеристика микроскопа особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется объективом и конденсором. Таким образом, чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть.

Разрешающая способность невооруженного глаза человека составляет 200 мк, т.е. 0,2мм. Наименьшие частицы, которые видны в современные световые биологические микроскопы, имеют величину больше 1/3 длины волны света, т.е. 0,2 мк. Чтобы увидеть такие частицы невооруженным глазом, их необходимо увеличить в 1000 раз. Такое увеличение называется полезным и у современных биологических микроскопов доведено до 2000 раз. Световые микроскопы с бблшим увеличением на практике дают расплывчатые и искаженные изображения, не открывая новых деталей, поэтому они не применяются.

Величина разрешающей способности микроскопа зависит от длины волны используемого света и суммы числовых апертур объектива и конденсора:

$$d=W\lambda I+A_2,$$

где d - минимальное расстояние между двумя точками, λ - длина волны используемого света, A_1 - числовая апертура объектива, A_2 - числовая апертура конденсора.

Числовая апертура определяется произведением синуса половины (α) отверстного угла(α) на показатель преломления (n) среды, граничащей с линзой: $A=n \sin \alpha$. Иными словами, числовая апертура - это

"охват" линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу.

Используя объективы с большой апертурой и освещая препарат светом с более короткой длиной волны, можно увидеть более мелкие объекты (вплоть до крупных вирусов) или различить в клетке более тонкие структуры.

Числовая апертура любой линзы, граничащей с воздухом, не может быть больше 1, так как показатель преломления воздуха равен 1, а угол u не может быть больше 90° (т.е. $\sin u=1$). Практически в микроскопе МБР-1 объектив 40х имеет апертуру, равную 0,65, а конденсор - апертуру около 1. Тогда максимальное разрешение микроскопа, т.е. наименьшая видимая структура, при использовании, например, объектива 40х и зеленого света с длиной волны 550 нм (0,55мкм) будет равна: $0,55/0,65 + 1 = 0,33$ мкм.

Повысить разрешающую способность микроскопа можно двумя Пу-тями: *либо освещая объект еще более короткими лучами света, например ультрафиолетовыми, либо увеличивая показатель преломления среды, граничащей с линзой, с тем чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект (n стекла $\sim 1,5$).* Последнее весьма часто применяют на практике: между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом помещают каплю так называемого иммерсионного масла, имеющего $n \sim 1,5$ (*иммергирование объектива*). Тем самым повышают апертуру объектива до $\sim 1,2$, а разрешение доводят до 0,25 мк.

Величина числовой апертуры каждого объектива указывается на его оправе. Сухие системы - 8х и 40х (объективы, граничащие с воздушной средой) - имеют апертуру 0,20 и 0,65 соответственно. Объективы, имеющие апертуру 1,25, называются *иммерсионными* и обозначаются "МИ" (масляная иммерсия). На оправе этих объективов имеется черное кольцо. Иммергировать объектив можно не только маслом, но и другими жидкостями, имеющими показатель преломления бблший, чем показатель преломления воздуха, например водой ($n=1,3$), глицерином ($n=1,4$). Для каждой из этих жидкостей выпускаются специальные объективы.

Приведенные выше сведения позволяют говорить о двух функциях микроскопа: увеличении и разрешении. *Разрешение определяет отчетливость получаемого изображения, а увеличение - это получение изображения, увеличенного в той или иной степени.* Повышение увеличения с помощью более сильного окуляра не улучшает разрешения, так как окуляр не может изменить качества получаемого изображения, последнее зависит только от объектива. *Поэтому лучше использовать объектив с бблшим увеличением и окуляр с меньшим увеличением, чем наоборот.*

Разрешающую способность микроскопа, напротив, легко ухудшить, не меняя увеличения. Предположим, что в оптическую систему не внесено никаких изменений, за исключением уменьшения величины диафраг-

мы конденсора. Тогда угол u , под которым свет попадает в объектив, уменьшится и, следовательно, уменьшится числовая апертура объектива. В результате разрешающая способность понизится, т.е. ухудшится качество изображения, однако увеличение останется прежним, так как ни объектив, ни окуляр не менялись. Приведенный пример показывает, какое большое значение приобретает правильное использование конденсора. *Правильное обращение с ирисовой диафрагмой конденсора, которой не редко пользуются не для снижения апертуры, а для изменения освещенности, необоснованное опускание и поднятие конденсора приводит к реальному ухудшению качества, а иногда и искажению микроскопической картины.*

Оптимально числовая апертура конденсора должна быть такой же, как и у объектива. Апертура конденсора микроскопа МБР-1 равна 1,20. Этого значения можно достигнуть только в случае его иммергирования, т.е. при помещении иммерсионного масла между верхней линзой конденсора и нижней поверхностью предметного стекла. Можно также иммергировать водой. Неиммергированный конденсор имеет апертуру около 1,0 (практически - не более 0,95).

В случае, когда апертура конденсора меньше апертуры объектива, последняя будет использована не полностью, и разрешающая способность снизится. Если апертура конденсора больше апертуры объектива, что, в частности, бывает при работе с сухими системами, то необходимо несколько прикрыть ирисовую диафрагму конденсора. Это приведет к устранению рассеянного света и даст нужную контрастность изображения.

Никогда не следует использовать конденсор или его ирисовую диафрагму для регулировки яркости поля зрения. Яркость регулируют либо изменением степени накала лампы осветителя при помощи реостата, либо применяя светофильтры, которые лучше устанавливать между осветителем и микроскопом.

Осветитель составляет неотъемлемую часть микроскопа, так как в настоящее время в исследовательской микроскопии применяется исключительно электрический свет. Источник света, либо смонтированный внутри микроскопа и имеющий ограниченную регулировку, либо (что предпочтительнее) внешний и перемещаемый. Во многих современных микроскопах (МБИ-2Б, МБИ-6 и др.) осветительный аппарат вместе с источником света вмонтирован в основание микроскопа. Микроскоп МБР-1 и С-11 не имеют такого устройства, поэтому для искусственного освещения применяются специальные осветители. Наиболее часто используемый осветитель ОИ-19 имеет низковольтную лампу накаливания (8в, 20вт) с короткой толстой нитью. Лампу включают в сеть через понижающий трансформатор, в корпусе которого имеется реостат с рукояткой, регулирующий накал лампы. Патрон с лампочкой может свобод-

но передвигаться в корпусе осветителя, который укрепляется на нужной высоте в специальном штативе. Перед лампой в корпусе осветителя помещен двухлинзовый конденсор с ирисовой диафрагмой и гнездо для светофильтра. Осветитель устанавливают перед микроскопом на соединительной планке.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ

1. Место для микроскопа выбирается подальше от прямого солнечного света.
2. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз.
3. Смотреть в окуляр рекомендуется левым глазом, не закрывая правого.
4. Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой - основание микроскопа.
5. Следует предохранять микроскоп от толчков и соприкосновения с веществами типа кислот и щелочей.
6. Не рекомендуется вынимать окуляр из тубуса, чтобы не загрязнять пылью тубус и объективы.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, описание прибора (технич. паспорт), футляр с принадлежностями (набор объективов 8х, 40х, 90х, окуляр 15х, клеммы, зеркало), осветитель ОИ-31 (вставляется в штатив микроскопа), удлинитель с розетками.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, постоянный препарат дрожжей, окрашенных простой окраской, хлопчатобумажная (х/б) ткань.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: микроскоп С-11.

ЗАДАНИЕ: 1. Проверить и подготовить микроскоп к работе.

2. Установить свет по методу Кёлера.

3. Промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать постоянный препарат дрожжей при объективах 40х и 90х, окуляр 15х. *Обратить внимание на форму клеток и их расположение относительно друг друга.* Вычислить увеличение микроскопа в каждом конкретном случае.

4. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.

5. Препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.

6. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

Подготовка микроскопа осуществляется следующим образом.

1. Плавно поднять тубусодержатель макровинтом и осмотреть состояние угловой резьбы на кронштейне штатива.

2. Ослабить винт для крепления тубуса и проверить вращение тубуса вокруг вертикальной оси. Закрепить тубус винтом в удобном для работы положении.

3. *Осторожно* вращать револьвер вокруг его оси, отмечая при этом звук щелчка (при его отсутствии револьвер не пригоден для работы).

4. Опустить конденсор вниз, а затем поднять вверх так, чтобы верхняя линза конденсора находилась в одной плоскости с предметным столиком. В противном случае конденсор необходимо достать из крепежной системы и вновь поместить туда в правильном положении. Проверить перемещение оправы для светофильтров.

5. Достать объективы 8х, 40х и 90х из футляров. Найти все обозначения на оправе (увеличение, числовая апертура, завод-изготовитель и т.п.), отметить отличительные особенности на оправе объектива 90х. Проверить подвижное крепление фронтальных линз объективов 40х и 90х. Если подвижность отсутствует, протереть объективы спирт-эфирной смесью.

6. Вкрутить последовательно объективы 8х, 40х и 90х в револьвер микроскопа так, чтобы между 8х и 90х объективами находилось пустое гнездо. Вверху тубуса вместо заглушки поместить окуляр 15х.

7. Достать из футляра осветитель ОС-31. Ослабив винт крепления лампы, проверить свободное перемещение патрона с лампой в корпусе осветителя вокруг собственной оси и в горизонтальной плоскости. Поместить осветитель в гнездо микроскопа и подключить в электросеть.

Установка света по Кёлеру

Наилучшие результаты при работе с микроскопом могут быть получены, как указывалось, лишь при условии правильного освещения объекта. Лучший способ освещения основан на системе Кёлера. На микроскопе С-11 с осветителем ОС-31 практически это выполняется следующим образом.

1. На предметный столик поместить препарат и **закрепить клеммами**.

2. Установить объектив 8х на рабочее расстояние (И см).

3. Поднять конденсор вверх до упора. **Закрывать ирисовую диафрагму конденсора полностью**.

4. Глядя в окуляр и ослабив винт крепления лампы, спроецировать в центр поля зрения спираль лампы.

5. Сфокусировать препарат *макровинтом*.

Поскольку все работы с микропрепаратами следует проводить с объективами 40х и 90х, для дальнейшей работы с объективом 40х необходимо:

6. Ничего не изменяя, поворотом револьвера осторожно (чтобы не задеть предметное стекло) установить объектив 40х на оптическую ось.

7. Глядя в окуляр, *приоткрыть ирисовую диафрагму*. Уточнить контуры изображения микровинтом.

Для работы с объективом 90х необходимо:

8. Ничего не изменяя, поворотом револьвера убрать объективы с оптической оси и нанести каплю иммерсионного масла на выбранный участок препарата.

9. Установить объектив 90х на оптическую ось. *Открыть ирисовую диафрагму полностью*.

ю. Уточнить контуры изображения микровинтом.

11. *После работы с препаратом не забудьте убрать иммерсионное масло с объектива спирт-эфирной смесью!* Для этого по окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной смесью. *Оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксированию пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа.* Очищать объектив от иммерсионного масла ксилолом не рекомендуется, так как последний может растворить состав, склеивающий линзы объектива.

Если при всей тщательности вашей работы вы не можете найти изображение препарата на объективах 40х и 90х, необходимо проделать следующее:

1. *Глядя сбоку микроскопа* (иначе можно раздавить линзу объектива и препарат), опустить нужный вам объектив до соприкосновения со стеклом препарата. Необходимо иметь в виду, что фронтальная линза высокоапертурных иммерсионных объективов слабо держится в оправе и при грубом обращении легко может сместиться.

2. Глядя в окуляр, осторожно сфокусировать препарат макровинтом. *Движения должны быть медленными*, т.к. фокусное расстояние очень мало.

3. Уточнить изображение препарата микровинтом.

ПРИЧИНЫ НЕУДАЧ ПРИ РАБОТЕ С ОБЪЕКТИВОМ 90х:

- *Плохо закреплено предметное стекло клеммами!*
- *Масло подсохло или в него попал пузырек воздуха. Сменить поле зрения, нанести новую каплю масла.*
- *Грязный объектив. Протереть фронтальную линзу спирт-эфирной смесью.*

ВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАПИСЕЙ

Лабораторные работы можно оформлять в обычной тетради, где необходимо аккуратно, четко и в определенном порядке записывать дату и тему занятия, задания с условиями проведения исследований.

Под каждым заданием во время микроскопирования делается соответствующий рисунок, который должен быть нарисован тонкими и отчетливыми линиями без штриховки и раскрашивания. Выполнять его следует тщательно, остро отточенным простым карандашом (лучше твердости НВ). Каждый рисунок должен иметь название, указание об увеличении микроскопа и сопровождаться подробными обозначениями, а идущие от них линии не должны пересекаться. Рисовать следует только то, что вы действительно видите, и, конечно же, не копировать рисунки с чужих тетрадей и книг. Некоторые работы, кроме рисунков, должны сопровождаться выводами.

Необходимо выработать привычку сразу оформлять работу по ходу ее выполнения на занятиях. Записи на клочках бумаги недопустимы.

Задание считается выполненным после того, как преподаватель просмотрит ваш препарат и подпишет оформленный рисунок.

Вопросы для самопроверки

1. Что собой представляет микробиологическая лаборатория? Как осуществляется в ней дезинфекция воздуха, пола, стен и мебели?

2. Что такое микробиологический бокс, для чего он предназначен?

3. Какие средства используются для дезинфекции лаборатории и бокса?

4. Что такое микроскоп, каковы его функции?

5. Из чего состоят механическая и оптическая части микроскопа? Каковы их назначения?

6. Где расположена и для чего используется ирисовая диафрагма?

7. Чему равно увеличение микроскопа, от чего оно зависит?

8. Для чего служат линзы конденсора, объектива, окуляра? Сколько их может быть в этих деталях микроскопа?

9. Что такое апертура линзы и как ее определить? Как узнать числовую апертуру объектива?

10. Что такое разрешающая способность микроскопа и как ее можно изменять?

11. Какие объективы имеют большую разрешающую способность и почему? Какие окуляры дают большее увеличение и почему?

12. Определенную клеточную структуру можно окрасить в бледно-розовый цвет. Однако она будет плохо видна в обычный микроскоп со светлым полем. Какую простую модификацию вы можете предложить, чтобы увеличить контраст между структурой и окружающей средой?

И. Что произойдет с изображением, если образец находится в жидкости,

а покровное стекло отсутствует? Приведите основные соображения по поводу использования покровных стекол в микроскопии.

14. Если клетки суспендированы в жидкости с показателем преломления таким же, как у клеток, то как они будут выглядеть при микроскопировании?

15. Чем различаются светопольная, фазово-контрастная, люминесцентная и электронная микроскопии между собой?

Занятие № 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДАМИ "РАЗДАВЛЕННАЯ КАПЛЯ", "ВИСЯЧАЯ КАПЛЯ И "ОТПЕЧАТОК". ПРАВИЛА РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫРОСШИХ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Освоить прием взятия микробиологического материала из жидкой среды в стерильных условиях. Научиться изготавливать и микроскопировать различные типы прижизненных препаратов микроорганизмов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, имеющих толщину не более 1,2 - 1,4 мм. *Применение более толстых стекол* не позволяет получать резкое изображение краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата (это изображение попадает в толщу стекла), т.е. нарушает фокусировку конденсора, что *резко снижает четкость изображения*. Чрезмерная толщина предметного стекла в особенности недопустима при работе с иммерсионным объективом, когда необходимо полностью использовать числовую апертуру системы.

Важным моментом является подготовка поверхности предметных стекол, что особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов. *Поверхность стекла должна быть очищена и обезжирена так, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в выпуклые, медленно высыхающие капли.*

Наиболее надежный способ обезжиривания - обработка стекол хромовой смесью с последующим споласкиванием водой и спиртом. Хорошие результаты дает протирание вымытых и высушенных стекол чистой ваткой, смоченной эфиром (после этого промывание водой уже не требуется), или, наконец, обжигание поверхности стекла в пламени

горелки (жир при этом сгорает). **Кипячение стекол в растворах щелочей не рекомендуется, так как щелочи разъедают стекло и поверхность его становится матовой.**

Хранить чистые обезжиренные стекла можно в сухом состоянии или в спирте.

В повседневной работе при приготовлении препаратов вполне достаточно на *чистое обезжиренное сухое* стекло нанести небольшое количество сухого мыла, после чего *тщательно* вытереть его чистой хлопчатобумажной салфеткой (избыток мыла на стекле плохо удаляется и может приводить к деструкции исследуемых клеток).

Покровные стекла, применяемые обычно для приготовления препаратов живых бактерий и наблюдений с сухими системами, также должны быть тщательно вымыты и высушены. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15 - 0,1 Тдш. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Наблюдать микроорганизмы в живом состоянии можно на препаратах "раздавленная капля", "висячая капля", "отпечаток", в капиллярах Перфильева. Микроскопирование препаратов проводят с "сухими системами" (объективы 8х и 40х) микроскопа.

Препарат "раздавленная капля"

Препарат "раздавленная капля" позволяет установить наличие или отсутствие подвижности, форму клеток крупных или мицелиальных микроорганизмов, их размеры и взаимное расположение, способ спорообразования.

Если исследуемая культура выращена в жидкой среде, то на предметное стекло суспензию клеток или другой исследуемый материал (огуречный рассол, загнивший бульон и т.п.) наносят с помощью стерильной пипетки. При исследовании негустых суспензий микробных клеток каплю воды на предметное стекло можно не наносить.

Если же исследуемые микроорганизмы растут на плотной питательной среде, то микробную массу переносят с помощью бактериологической петли. В этом случае сначала на предметное стекло наносят маленькую каплю водопроводной воды (использовать дистиллированную воду нельзя, т.к. отсутствие в ней солей может привести к нежелательным изменениям клеток микроорганизмов), а затем переносят в неё небольшое количество клеток, которые размешивают на стекле петлей до образования однородной клеточной суспензии.

Капля с исследуемым материалом должна быть такой, чтобы после прижимания ее покровным стеклом жидкость не выступала из-под стекла. Если имеется избыток жидкости, то его следует удалить фильтровальной бумагой. Приготовленный таким образом препарат помещают на предметный столик микроскопа и рассматривают.

Препарат "висячая капля"

Препарат " висячая капля " используют для выявления подвижности и отношения клеток к химическим раздражителям. Кроме того, возможны длительные наблюдения за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор.

Для приготовления данного препарата небольшую каплю суспензии микроорганизмов петлей наносят на покровное стекло, которое переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки.

Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметически заключенной во влажной камере, что допускает многодневное наблюдение за объектом. При этом целесообразно пользоваться стерильным стеклом, а суспензию бактерий готовить не в воде, а в жидкой питательной среде.

Препарат "отпечаток"

Эти препараты удобны для изучения естественного расположения клеток в колонии микроорганизмов и чаще всего для исследования формы спор и спороносов у актиномицетов и мицелиальных грибов.

Метод отпечатков состоит в следующем. Из агаризованной среды в чашке Петри, на которой изучаемые микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем кубик (блок) и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или 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 и рассматривают под микроскопом.

Такой же отпечаток можно получить и на стекле, если касаться поверхности колонии предметным стеклом. Отпечатки можно фиксировать и окрашивать любым способом.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, штатив, стерильная пипетка.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные и покровные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: огуречный или капустный рассол, кусок хлеба с плесенью.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Приготовить, промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать прижизненные препараты микрофлоры огуречного рассола (метод "раздавленная капля" и "висячая капля", объектив 40х). Указать увеличение микроскопа.
 2. Приготовить, промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать прижизненный препарат хлебной плесени (метод "отпечаток", объектив 40х). Указать увеличение микроскопа.
 3. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 4. Препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 5. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

•♦

т

••

Методические указания

Микроорганизмы в лабораторных условиях выращивают обычно в пробирках, колбах, чашках Петри в жидких и на плотных питательных средах. В том случае, когда нужно приготовить препарат или произвести пересев культуры микроорганизмов, выросшей в жидкой питательной среде, пользуются стерильной пипеткой, реже петлёй.

Для этого необходимо проделать следующие манипуляции.

1. Достать пипетку за верхний конец из бумаги, в которой она стерилизовалась, и взять средним и большим пальцами правой руки так, как держат карандаш.

2. В левую руку взять пробирку (колбу) с жидкой средой. Пробирку (колбу) держат несколько в наклонном положении.

3. Не выпуская пипетки, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижать наружный конец ватной пробки к ладони, достать пробку из пробирки (колбы) и держать так во время последующих манипуляций.

4. Края открытой пробирки (колбы) слегка обжечь в пламени горелки. Быстро проведя пипетку через горячую зону пламени, ввести пипетку в пробирку (колбу) и отобрать небольшое количество микробной массы. Отбор жидкой культуры пипеткой можно производить с помощью резиновой груши.

5. Горлышко пробирки (колбы) и внутренний конец ватной пробки снова обжечь в пламени горелки и закрыть ею пробирку (колбу). Пробирку с

культурой поставить в штатив (на стол), а извлеченный материал использовать для приготовления препарата. *Использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор (например, 3-5%-ный водный раствор фенола), не касаясь ею окружающих предметов.*

ВНИМАНИЕ ! Техника безопасности. *Если конец ватной пробки загорится, то НЕ СЛЕДУЕТ БРОСАТЬ ПРОБКУ. Ее нужно быстро ввести в пробирку (колбу), где вата сама потухнет. НИ В КОЕМ СЛУЧАЕ НЕЛЬЗЯ ДУТЬ НА ЗАГОРЕВШУЮСЯ ПРОБКУ, так как это поддержит и усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует ее снова вставлять в пробирку. Нужно взять другую стерильную пробку и провести всю операцию заново.*

ВНИМАНИЕ ! Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят в стерильной зоне пламени горелки (но не в пламени!) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Работать следует в халатах, длинные волосы должны быть аккуратно заколоты и убраны с лица. **НЕЛЬЗЯ** делать резких движений, отвлекать, разговаривать и ходить около человека, проводящего работу с микроорганизмами. В противном случае возможен несчастный случай, кроме того, движение воздуха увеличивает возможность загрязнения культуры. *Препараты, работа с которыми закончена, выдерживают в дезинфицирующем растворе, а затем моют.*

Для приготовления препаратов необходимо:

1. Приготовить предметное стекло. Для этого, взяв предметное стекло за короткие боковые грани большим и указательным пальцами левой руки, провести по нему кусочком мыла, увлажнить и протереть х/б тканью. Поместить его на стеклянный мостик над кристаллизатором.
2. На подготовленное стекло перенести исследуемую культуру одним из способов, указанных выше.
3. Покровное стекло протереть х/б тканью и поместить на клеточную суспензию препарата. Прижать покровное стекло к предметному стеклу полоской фильтровальной бумаги, удалив при этом излишек клеточной суспензии.
4. Препарат поместить на предметный столик микроскопа, зажать клеммами, настроить освещение по Кёлеру (см. занятие N1), промикроскопировать и зарисовать.

Обратите внимание на все признаки микроорганизмов, которые можно выявить с помощью данных препаратов, и укажите их на рисунках.

Вопросы для самопроверки

1. Какие типы прижизненных препаратов вы знаете?
2. Какие признаки микроорганизмов можно выявить на препарате "раздавленная капля", "висячая капля", "отпечаток", в капиллярах Перфильева?
3. Из каких этапов складывается метод приготовления прижизненных препаратов? Какие процедуры влияют на качество препаратов при изготовлении? Чем это можно объяснить?
4. В чём особенности приготовления препаратов "раздавленная капля", "висячая капля" и "отпечаток"?
5. С помощью каких препаратов можно проводить многодневные наблюдения?

Занятие № 3

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Освоить прием взятия микробиологического материала с твердой среды в стерильных условиях, научиться изготавливать и микроскопировать фиксированные препараты микроорганизмов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ФИКСИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Для выявления некоторых морфологических особенностей, количественного учета микроорганизмов, проверки чистоты культуры и ряда других целей готовят фиксированные окрашенные препараты, которые могут храниться длительное время.

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло наносят маленькую каплю водопроводной воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала, как для препарата "раздавленная капля". Получившуюся суспензию равномерно размазывают петлей или краем покровного стекла на площади 1-2 см² как можно более тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонким, чтобы высохал почти тотчас же после приготовления.

Высушивание мазка. Лучше всего сушить препарат при комнатной

температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро (не более 1 мин). Если высушивание мазка замедленно, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. *Эту операцию следует проводить крайне осторожно, не перегревая мазка, иначе клетки микроорганизмов деформируются.*

Фиксация. Фиксация препарата преследует несколько целей: убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними, обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу и сделать мазок более восприимчивым к окраске (мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые).

Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. *Не следует перегревать мазок, так как при этом могут произойти грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток*, например их сморщивание. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами. В этом случае фиксирующую жидкость либо наливают на мазок, либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксатором. Чаще всего пользуются этиловым спиртом (время фиксации 15-20 мин), метиловым спиртом (время фиксации 3-5 мин), смесью равных объемов этилового спирта и эфира (препарат погружают на 15-20 мин в смесь или заливают мазок и дают смеси испариться). Существует целый ряд других фиксаторов. По окончании фиксации препарат отмывают от фиксатора, осторожно обливая его водопроводной водой, и окрашивают.

Окраска. Для окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются анилиновыми красителями, среди которых различают кислые и основные. К кислым красителям относятся те, у которых ион, придающий окраску (хромофор), является анионом, у основных красителей хромофором является катион. Примером кислых красителей служат эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин - все эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими (основными) компонентами клетками. Основные красители - основной фуксин, генциан-виолет, метиленовый синий, кристаллический фиолетовый, сафранин - более интенсивно связываются с ядерными (кислыми) компонентами клетки. При исследовании микроорганизмов чаще применяют основные красители, т.к. бактерии по отношению к красителям ведут себя так, словно они состоят в основном из нуклеиновой кислоты, которая легко реагирует с основными красителями. Механизм окрашивания клеток окончательно ещё не изучен.

Различают простые и дифференциальные способы окрашивания клеток. При простой окраске прокрашивается вся клетка так, что хоро-

шо видны ее форма и размеры. При дифференциальной окраске окрашивается не вся клетка, а определенные её структуры, и поэтому такой тип окраски используется для выявления и изучения конкретных клеточных структур. В этом случае окраску препарата проводят не одним, а несколькими красителями.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином и генциан-виолетом. Для этого фиксированный препарат помещают на приспособления-перекладины или так называемые препаратодержатели (параллельно расположенные стеклянные палочки длиной 20-30 см, соединенные резиновыми трубками). Палочки устанавливают над фарфоровыми или стеклянными чашками или ваннами. Препарат обливают из пипетки раствором выбранного красителя. Следует обращать внимание на то, чтобы конец пипетки не касался мазка. Обычно бывает достаточно покрыть мазок несколькими каплями красителя. Время окрашивания указанными красителями колеблется от 1 до 3 мин. Нужно следить, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал, в случае необходимости доливают новые порции.

По окончании окраски препарат промывают струей воды до тех пор, пока стекающая вода станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают его фильтровальной бумагой и рассматривают с иммерсией. *В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается совершенно светлым и чистым, а окрашенными оказываются только клетки микроорганизма.*

Для получения более чистых препаратов краску можно наливать на мазок, покрытый фильтровальной бумагой, или воспользоваться модифицированным методом Синева, при котором применяют фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем. В этом случае окрашивание производят следующим образом. На фиксированный мазок наносят несколько капель дистиллированной воды, накладывают полоску сухой фильтровальной бумаги, пропитанную красителем, и прижимают ее пинцетом к поверхности стекла. По истечении времени окрашивания фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой, сушат и рассматривают с иммерсией.

Описанный метод относится к так называемым **позитивным** способам окраски, когда окрашиваются клетки микроорганизмов. Помимо этого существует так называемое **негативное** контрастирование, когда краситель заполняет пространство, окружающее клетки, и не проникает в сами клетки, в результате чего микроорганизмы выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном фоне. Для негативного окрашивания чаще всего пользуются жидкой тушью, водными растворами конго-рота (3%), нигрозина (10%) и некоторыми другими красителями. Окрашивание негативными красителями можно вести двумя путями: либо

раствор красителя наносят на сухой фиксированный мазок, дают ему высохнуть и затем рассматривают с иммерсией, либо каплю исследуемой суспензии бактерий смешивают с красителем непосредственно на предметном стекле, покрывают ее покровным стеклом и изучают с сухой системой. В последнем случае негативное окрашивание можно комбинировать с прижизненной окраской клеток. Для этого каплю исследуемой суспензии микроорганизмов помещают вначале в каплю разбавленного раствора фуксина, а затем смешивают с каплей туши и закрывают покровным стеклом.

ВНИМАНИЕ {Техника безопасности. Препараты, работа с которыми закончена (предметные и покровные стекла), прежде чем вымыть, помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Культуры микроорганизмов, подлежащие выбрасыванию, необходимо сначала уничтожить.

Работа с красителями требует осторожности и внимания! Они легко окрашивают и трудно удаляются с окружающих предметов (стол, инструменты, кожа рук), либо вовсе не удаляются (натуральные и синтетические ткани).

Взятие исследуемого материала с твердой среды

Как указывалось выше, микроорганизмы выращивают в пробирках, колбах, чашках Петри на жидких и твердых питательных средах.

При извлечении части клеток для приготовления препарата микроорганизмов, выращенных на поверхности плотной среды, необходимо строго соблюдать условия, которые позволили бы предохранить культуру от загрязнения другими микроорганизмами. Клетки для препаратов берут бактериологической петлей или иглой и работают в стерильной зоне пламени.

Петля представляет собой тонкую проволоку из платины или никрома, прикрепленную к стеклянному или металлическому держателю. Конец проволоки загибают в виде кольца (диаметром около 2 мм), которым и захватывают небольшое количество микробной массы. Однако предварительно такую петлю необходимо простерилизовать, т.е. уничтожить имеющиеся на ней микроорганизмы.

Стерилизацию бактериологической петли проводят в пламени горелки, прокаливая докрасна проволоку и обжигая примыкающую к ней часть держателя, вводимую внутрь пробирки (колбы, чашки Петри). Петлю рекомендуется держать в пламени горелки почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерно раскалена. Однако прикосновение к культуре клеток слишком горячей петлей приводит к их повреждению. Поэтому петлю следует предварительно охладить, прикоснув-

шись ею к внутренней поверхности пробирки (крышке чашки Петри) или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов. При этом горячая петля вызывает плавление среды.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, штатив, бактериологическая петля, колба, пробирка с пробкой, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления и промывания препаратов, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кушечки сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: чистые культуры *Saccharomyces sp.*, *Bacillus sp.*, микрофлора зубного налета.

- ЗАДАНИЕ:**
1. С помощью пустой пробирки с пробкой освоить технику отбора исследуемого материала в стерильных условиях (во избежание ожогов и загрязнения культуры).
 2. Приготовить, промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать постоянные препараты *Saccharomyces sp.* и *Bacillus sp.* (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х), препарат зубного налета (окраска водным фуксином в течение 5-7 мин, объектив 90х). Указать увеличение микроскопа.
 3. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 4. Препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 5. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

Извлечение микроорганизмов из пробирки для приготовления препарата или для посева в иную среду производится следующим образом.

1. Пробирку с чистой культурой взять в левую руку таким образом, чтобы хорошо была видна вся поверхность питательной среды с выросшими на ней микроорганизмами. Пробирка должна находиться в горизонтальном положении или несколько наклонно.

2. В правую руку взять петлю для посева так, как держат карандаш, и прокалить ее в пламени горелки, как указано выше. *Помните, что все последующие манипуляции необходимо проводить около пламени спиртовки.*

3. Не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижать ватную пробку к ладони, достать ее из пробирки и держать так во время последующих манипуляций.

4. Краю открытой пробирки с культурой обжечь в пламени горелки и

после этого ввести в пробирку стерильную петлю.

5. Взяв небольшое количество микробной массы с поверхности субстрата, достать петлю из пробирки, следя за тем, чтобы переносимый материал не касался стенок или краев пробирки.

6. Горлышко пробирки и ватную пробку обжечь в пламени горелки и закрыть пробирку. **ВНИМАНИЕ I** *Если конец ватной пробки загорится, то не следует бросать пробку. Ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет. Нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это поддержит и усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует ее снова вставлять в пробирку. Нужно взять новую пробку и начать всю операцию заново.*

7. Закрытую ватной пробкой пробирку с культурой поместить в штатив, а извлеченный материал использовать для приготовления препарата.

8. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле после приготовления препарата, сжечь в пламени горелки. В этом случае прокалывание петли начинается с участка проволоки, примыкающей к колышу, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсохли и не образовали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводят в вертикальное положение, прокалывают докрасна и только после этого ставят на место.

ВНИМАНИЕ ' Техника безопасности. *После окончания работы культуры микроорганизмов, подлежащие выбрасыванию, необходимо убивать. Для этого сосуды с культурами (колбы, пробирки, чашки Петри и т. д.) авто/сливуют и только после этого моют. Или поверхность плотных сред заливают дезинфицирующим раствором, через сутки среды выбрасывают и моют посуду. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля !*

Для приготовления препаратов необходимо:

1. Приготовить предметное стекло (см. занятие N 2).
2. На подготовленное стекло перенести исследуемую культуру с помощью бактериологической петли, соблюдая все меры предосторожности, указанные выше.
3. Приготовленную клеточную суспензию *высушить на воздухе*, зафиксировать в пламени спиртовки, окрасить, промыть водой из колбы и промокнуть фильтровальной бумагой.
4. Препарат поместить на предметный столик микроскопа, зажать клеммами, настроить освещение по Кёлеру (см. занятие N1), промикроскопировать и зарисовать.

Обратите внимание на все признаки микроорганизмов, которые можно выявить с помощью данных препаратов, и укажите их на рисунках.

Вопросы для самопроверки

1. Какие характеристики микроорганизмов можно изучать с помощью фиксированных препаратов?
2. Какие красители используются в микробиологии? Чем они отличаются друг от друга? Как ведут себя клетки по отношению различным красителям?
3. Какие способы окраски клеток микроорганизмов вы знаете? В чем их принципиальное отличие друг от друга?
4. Из каких этапов складывается метод приготовления фиксированных препаратов? Какие процедуры влияют на качество препарата при его изготовлении? Чем это можно объяснить?
5. Какие культуры микроорганизмов желательно изучать только на фиксированных препаратах и почему?
6. Почему в микробиологии для исследования микроорганизмов применяют как фиксированные, так и прижизненные препараты?

Занятие № 4

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ И ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепление приобретенных навыков приготовления и микроскопирования прижизненных и фиксированных препаратов микроорганизмов. Изучение формы клеток, типов их скоплений, выявление подвижности и особенностей морфологии и цитологии эукариотических и прокариотических клеток.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОКАРИОТ

Изучение морфологических признаков микроорганизмов часто необходимо для их идентификации и выяснения их таксономического положения. К морфологическим характеристикам относятся *форма клеток, их сочетания и размеры, способность к образованию спор и капсул, а также наличие в клетках некоторых включений*. Перечисленные особенности выявляют разными методами микроскопии и различными способами окраски клеток. *При описании морфологии клеток следует указывать возраст культуры, состав среды и условия культивирования.*

Форму и соединение клеток определяют при микроско-

пировании молодой (чаще всего суточной) культуры микроорганизмов, выращенной обычно в жидкой среде. Для этого готовят препараты живых или фиксированных окрашенных клеток и микроскопируют первые в сухой системе, вторые - в иммерсионной.

/Хотелось бы обратить внимание на то, что форма кокковидных клеток не всегда бывает такой строго шаровидной, как ее изображают в руководствах. Диаметр кокковидных форм колеблется от 1,0 до 2,5 мкм. Под влиянием различных факторов среды кокки могут превращаться в овальные, конические и эллипсовидные образования. Кроме того, коккам свойственно образование различных сочетаний, в зависимости от расположения клеток после деления. В соответствии с этим кокки делятся на несколько групп.

Бактерии шаровидные (кокки, греч. *kokkos*-ЗерНО, шарик). *Монококки* в природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток, например клетки *Micrococcus agilis* (micro-маленький, agilis-подвижный), *диплококки* (diploos-двойной) - шаровидные бактерии, делящиеся в одной плоскости и образующие пары клеток. К диплококкам относится *Azotobacter chroococcum*. Родовое название отражает его физиологическую функцию фиксировать азот атмосферы, видовое - способность продуцировать коричневый пигмент (chros-коричневующий) и шаровидную форму (kokkum). *Стрептококки* (streptos-цепь) - шаровидные бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости цепочки разнообразной длины, например *Streptococcus lactis*. Родовое название отражает характер расположения шаровидных клеток в виде цепочки, видовое - причастность стрептококка к молочнокислому брожению (lactis-молочный). *Тетракокки* - шаровидные бактерии, которые делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют группы, состоящие из четырех клеток. *Сарцины* (sarcio-соединяю) - шаровидные бактерии, которые делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют скопления кубической формы по 8 клеток. Располагаются они в виде правильного куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Для некоторых видов сарцин характерна упорядоченность расположения: отдельные сарцины формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, но уже с каждой стороны их находятся не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины (каждая по 4 клетки). В результате возникают пакеты по 32, 64 и т. д. клеток. *Sarcina flava* (сарцина желтая) - наиболее обычный представитель микрофлоры воздуха. *Микрококки* делятся в нескольких плоскостях и образуют скопления неопределенной формы. *Стафилококки* также делятся в нескольких плоскостях, но образуют скопления, напоминающие по форме гроздь винограда. Следует помнить, что в последних случаях в одной и той же культуре можно обнаружить всевозможные сочетания клеток.

Палочковидные бактерии имеют цилиндрические клетки, длина ко-

торых в среднем составляет 2-5, а иногда 10-12 мкм. Длина клеток одного и того же вида может в известной степени варьироваться в зависимости от возраста культуры и от условий выращивания: состава среды и значения pH, аэрации, температуры и других факторов. Ширина клеток является более устойчивым признаком и колеблется в основном в пределах от 0,5 до 1 мкм. Палочки могут быть соединены попарно или в цепочки разной длины. Большое диагностическое значение у них имеет форма концов клетки - она может быть округлой, тупой, квадратной, заостренной. Так, например, миксобактерии делятся на два порядка по форме вегетативных клеток: с заостренными концами - подпорядок *Cystobacterinae*, цилиндрические с тупо закругленными концами - подпорядок *Soranginae*. При видовой дифференциации бацилл форма концов клетки также используется в качестве одного из таксономических признаков.

Бактерии палочковидные делятся на две группы, резко различающиеся по способности выживать в неблагоприятных условиях. Палочковидные бактерии, которые образуют споры, называют бациллами, а не образующие их - истинными бактериями. Это отражено в латинских названиях палочковидных бактерий - *Bacillus* и *Bacterium*.

К бациллам относятся, например, *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В видовом названии *Bacillus mycoides* отражена ее способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибовидного налета (*mycoides* - грибовидный). Налет имеет вид как бы сложно переплетенных нитей, внешне напоминающих рост мицелия грибов. Поскольку *Bacillus mycoides* - спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, красителем прокрашивается, а спорогенная зона не прокрашивается, и под микроскопом клетки выглядят неравномерно окрашенными. Спорогенная зона, как более плотная и не прокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам. У аспорогенных палочек правильной формы цитоплазма клетки прокрашивается красителем равномерно, и под микроскопом клетки выглядят как тонкие, четко очерченные прокрашенные стройные палочки.

Бактерии нитчатой формы представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим влагищем (или чехлом). Нитчатые бактерии широко распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах они часто образуют охристые осадки. Железобактерии рода *Leptothrix* окисляют закисные формы железа в окисные, и гидрат окиси железа у них откладывается во влагищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. Размножаются *Leptothrix* делением концевой (молодой) клетки, обра-

щенной внутрь влагалища. При этом старые клетки как бы оттесняются (выталкиваются) молодыми, нить и влагалище в результате размножения и роста клеток удлиняются. Нередко старые клетки отчлениются от общей нити. На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных влагалищ (в виде тонких трубок) и другие ожелезненные структуры.

Бактерии извитой формы. *Вибрионы* (лат. *vibrio* - трепещущий, вибрирующий) - слегка изогнутые клетки. Изгиб их меньше половины окружности. *Спириллы* (лат. *spiro* - штопор), в отличие от вибрионов клетки, более длинные, толстые и извитые. Извитость или равна, или выше половины окружности. Спириллы могут иметь один завиток (в виде буквы С), два (в виде буквы S) или несколько (в виде спирали). *Спирохеты* - очень длинные гибкие и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков. Длина спирохет превышает толщину в 5-200 раз, например, зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные.

Определение размеров клеток проводят под микроскопом с помощью окулярной линейки (микрометра) или окулярного винтового микрометра, используя чаще всего 24-часовые культуры микроорганизмов. Размеры клеток особенно удобно определять, пользуясь фазово-контрастным устройством. Если клетки подвижны, препарат слегка подогревают или к капле используемой суспензии добавляют каплю 0,1%-ного водного раствора агар-агара. Фиксировать и окрашивать клетки нежелательно, так как это ведет к некоторому изменению их истинных размеров. Размеры клеток выражают в микронах.

Способ деления и обособления дочерних клеток после деления имеют также диагностическое значение. У фирмикутных бактерий, как правило, видна поперечная перегородка, в то время как у грациликутных бактерий и у дрожжей образуется перетяжка, видимая под микроскопом. Известно 3 основных способа разъединения клеток после деления: простой, внезапное раскалывание клеток ('*snapping*') и постепенное сгибание клеток ('*bending*'). Для коринеподобных клеток характерны 2-ой или 3-ий способы обособления клеток, приводящие к образованию V- или Y- форм. Такое расположение клеток наблюдается не только у коринеподобных бактерий, Y-формы можно обнаружить также в культурах бацилл и флавобактерий. Этот факт является еще одним подтверждением необходимости анализа всего комплекса признаков, характеризующих морфологические особенности культур, а не какого-либо одного.

Подвижность клеток определяют, используя молодую культуру (12-24 час), с помощью препарата "висячая капля". Если клетки подвижны, то они перемещаются в поле зрения в разных направлениях, в отличие от броуновского движения - пассивного перемещения клеток в токе воды в одном направлении. По характеру движения можно предпо-

ложительно судить о типе жгутикования. Если жгутики расположены на полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое, "винчивающееся", без покачивания из стороны в сторону, а при латеральном или перитрихальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

В световом микроскопе жгутики не видны, поэтому требуются специальные способы предварительного протравливания и окрашивания жгутиков специальными методами. В настоящее время такое окрашивание, требующее специальных навыков, используют редко, а характер жгутикования наблюдают под электронным микроскопом в препаратах, предварительно напыленных металлом.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-П, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, колба, штатив, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления препаратов (в капельнице) и вода для промывания препаратов (в колбе), коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные и покровные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: чистые культуры *Saccharomyces sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Sarcina sp.*, *Staphilococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Xantomonas maltophilia*.

- ЗАДАНИЕ:** 1. Приготовить, промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать прижизненные препараты *Saccharomyces sp.*, *Bacillus sp.* и *E. coli* (объектив 40х). Указать увеличение микроскопа. Отметить форму, размеры клеток относительно друг друга, типы скоплений, особенности делений (наличие перегородок и почек в делящихся клетках), отметить внутриклеточные структуры, подвижные формы и характер движения клеток.
2. Приготовить, промикроскопировать несколько полей зрения и зарисовать постоянные препараты *Streptococcus sp.* и *Sarcina sp.* (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х). Указать увеличение микроскопа. Отметить форму, размеры клеток относительно друг друга, особенности делений (наличие перегородок в делящихся клетках и типы скоплений клеток после деления), наличие в клетках темных гранул (метахроматические зерна или гранулы воллотины).
3. Промик
4. роскопировать и зарисовать постоянные препараты *Staphilococcus sp.*, *E. coli*, *Xantomonas maltophilia* (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин., объектив 90х, демонстрационный препарат). Отметить форму, размеры клеток относительно друг друга, особенности делений (наличие перегородок в делящихся клетках и типы скоплений

клеток после деления), наличие в клетках темных гранул (метахроматические зерна или гранулы воллотиона).

5. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем: показать препараты и рисунки.
6. Препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
7. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

Для приготовления препаратов необходимо:

1. Приготовить предметное стекло (см. занятие N 2).
2. На подготовленное стекло перенести исследуемую культуру с помощью петли, соблюдая все меры предосторожности (см. занятие N 3).
3. Приготовить прижизненные и фиксированные препараты (см. занятие N 2 и N 3).
4. Препарат поместить на предметный столик микроскопа, зажать клеммами, настроить освещение по Кёлеру (см. занятие N 1), промикроскопировать и зарисовать.

Обратите внимание на все признаки микроорганизмов, которые можно выявить с помощью данных препаратов, и укажите их на рисунках.

Вопросы для самопроверки

1. Какие формы клеток характерны для эукариотических и прокариотических микроорганизмов?
2. Какие способы деления микроорганизмов вам известны? Какие скопления образуют кокковидные и палочковидные клетки после деления?
3. Какими способами выявляют подвижные формы микроорганизмов? Чем они отличаются друг от друга?
4. С помощью каких приспособлений и как определяют размеры клеток микроорганизмов?

ПРИНЦИПЫ СОСТАВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, УСЛОВИЯ И СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ИНСТРУМЕНТОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с характеристиками питательных сред, необходимыми для выращивания микроорганизмов, и принципом их составления. Ознакомиться с условиями и способами выращивания микроорганизмов, способами стерилизации и пастеризации. Подготовить для стерилизации посуду и инструменты, необходимые в дальнейшей работе.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Любая микробиологическая работа и, следовательно, выполнение любой практической задачи связаны с приготовлением питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма. Среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки, - источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы.

Синтетические возможности микроорганизмов и способы получения ими энергии разнообразны, следовательно, различны и их потребности в источниках питания. Отсюда ясно, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует. Разнообразие обмена веществ микроорганизмов проявляется прежде всего в их отношении к источникам углерода и азота, вот почему эти элементы представлены в средах различными веществами и именно они определяют специфичность сред.

Автотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода углекислоту воздуха или карбонаты, тогда как потребности в углероде гетеротрофных микроорганизмов такими соединениями углерода не могут быть удовлетворены. Для развития гетеротрофных микроорганизмов среда должна содержать более восстановленные соединения углерода, которые в зависимости от физиолого-биохимических особенностей организма могут быть представ^

лены различными органическими соединениями, например кислотами, спиртами, углеводами или углеводородами.

Неодинаковы требования микроорганизмов и к источнику азота. Для культивирования микроорганизмов, фиксирующих молекулярный азот, используют среды, не содержащие соединений азота. В состав всех других сред входят различные азотосодержащие соединения. Это могут быть нитраты или соли аммония, одна или несколько аминокислот. Наконец, известны микроорганизмы, нуждающиеся в полном наборе аминокислот или белках.

Потребности разнообразных групп микроорганизмов в зольных элементах и микроэлементах удовлетворяются обычно за счет одних и тех же минеральных солей. Поэтому так называемый "минеральный фон" сред для многих микроорганизмов может быть очень близким по составу.

Кроме элементов, необходимых для конструктивных процессов, среда должна содержать и энергетический материал. В средах для культивирования гетеротрофных организмов соединения углерода в большинстве случаев являются и энергетическим материалом. В средах для хемоавтотрофных организмов эту роль выполняют минеральные соли.

Из вышесказанного ясно, что при составлении сред следует обязательно учитывать особенности обмена веществ микроорганизмов. Кроме того, среды для одного и того же микроорганизма могут быть разными в зависимости от задач исследования. Например, среда для длительного сохранения микроорганизмов в лабораторных условиях заметно отличается от сред, предназначенных для получения тех или иных продуктов обмена веществ.

Однако какой бы полноценной ни была бы среда, ее компоненты могут остаться недоступными, если активная кислотность среды (рН) не соответствует значениям, при которых возможно развитие изучаемых организмов. Поэтому, приготовив среду, проверяют значение рН и, если необходимо, доводят его до нужной величины растворами кислот (HCl , H_2SO_4), щелочей (NaOH , KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (BaHCO_3 , NaHCO_3). В процессе стерилизации значение рН среды может измениться, поэтому нередко требуется его дополнительное определение в стерильных средах и в случае надобности корректирование стерильными растворами кислоты или щелочи.

По составу среды для культивирования делят на две группы: естественные, или натуральные, среды неопределенного состава и синтетические среды.

Н а т у р а л ь н ы м и называют среды, которые состоят из продуктов животного и растительного происхождения. К таким средам относятся овощные или фруктовые соки, животные ткани, разведенная кровь,

молоко, вода морей, озер и минеральных источников, а также отвары или экстракты, полученные из природных субстратов, таких как мясо, навоз, почва, различные части растений. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в таких средах имеются, как правило, все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, так как не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды и образование продуктов обмена по ходу развития. Натуральные среды используются, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. Примерами натуральных сред неопределенного состава, которые широко применяются в лабораторной практике, служат мясо-пептонный бульон, неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенная вытяжка.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) служит средой для развития различных представителей гетеротрофных микроорганизмов. МПБ - это богатая питательная среда, но она почти не содержит углеводов. МПБ стерилизуют при 1 атм. в течение 20 - 30 мин.

Неохмеленное пивное сусло - хорошая среда для некоторых молочно-кислых бактерий, дрожжей, плесневелых грибов и других представителей гетеротрофных микроорганизмов, использующих сахара в качестве источника углерода и энергетического материала. В сусле содержатся аминокислоты, элементы нуклеиновых кислот, витамины (в основном группы В), безазотистые органические кислоты, минеральные соли, большое количество углеводов (до 20%, из которых 80% составляет мальтоза), т.е. все, что необходимо для развития наиболее требовательных сапрофитных микроорганизмов.

Дрожжевая среда используется для культивирования различных представителей гетеротрофных микроорганизмов. Основа дрожжевых сред - дрожжевая вода, к которой добавляют углеводы (1-2%) и минеральные соли, чаще всего K_2HPO_4 (0,04%) и NaCl (0,5%).

Картофельная среда используется в основном для выделения и культивирования видов рода *Clostridium* и других представителей амилотических бактерий.

Почвенная вытяжка применяется для выделения и культивирования почвенных микроорганизмов.

Синтетические среды - это среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение в соответствующие продукты обмена.

Для разработки синтетических сред необходимо знать потребности микроорганизмов в источниках питания и основные особенности их обмена веществ. В распоряжении микробиологов есть достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам натуральным средам неопределенного состава. В зависимости от потребностей микроорганизмов синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, как, например, среды для молочнокислых бактерий, но могут быть и довольно простыми по составу, как среды для автотрофных микроорганизмов.

В большинстве случаев синтетические среды готовят на водопроводной воде и микроэлементы не добавляют, так как они в небольших количествах всегда содержатся в водопроводной воде и могут поступать в среду из стекла посуды. Как правило, ограничиваются внесением только тех микроэлементов, к которым изучаемый микроорганизм проявляет повышенную требовательность.

В специальных целях, например при изучении потребностей микроорганизмов в отдельных компонентах минеральных солей, для приготовления синтетических сред используют дистиллированную воду. В этом случае микроэлементы вносят в среду обязательно.

Полусинтетические среды относят к числу натуральных сред, т. к. они содержат соединения известной и неизвестной химической природы. Такие среды находят широкое применение в технической микробиологии для получения аминокислот, витаминов и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

К полусинтетическим средам относятся, например, мясо-пептонный бульон с глюкозой и фосфорнокислым калием, картофельная среда с глюкозой и пептоном. Основой в указанных средах является компонент неопределенного состава. В других случаях основой полусинтетической среды могут служить соединения известного состава - углеводы, нитраты или соли аммония, фосфаты и другие, а соединения неопределенного состава - гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт - добавляются в незначительных количествах в качестве факторов роста и витаминов.

Гидролизат казеина используют, главным образом, как источник аминокислот. Чаще всего его готовят путем кислотного гидролиза. В таком гидролизате полностью отсутствует триптофан.

Дрожжевой автолизат используют как источник витаминов, аминокислот, в том числе триптофана, и других факторов роста, в частности пуринов и пиримидинов.

Кукурузный экстракт используют в качестве источника аминокислот и витаминов. Он содержит также большое количество органических кислот (молочной, уксусной, муравьиной) и зольных элементов. Кукурузный экстракт - это готовый продукт заводов крахмалопаточной

промышленности, в среду вносят в количестве от 0,5 до 4% (вес/объем среды), в зависимости от потребностей микроорганизмов.

По назначению различают элективные и дифференциально-диагностические среды.

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем непригодны для развития других. Эти среды были разработаны и введены в микробиологическую практику С. Н. Виноградским и М. Бейеринком. Они применяются, главным образом, для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания или для получения накопительных культур.

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида. Нередко в среды вводят красители-индикаторы, которые окрашивают в определенный цвет (например, колонии выделяемых микроорганизмов). Индикаторные среды применяются в клинической бактериологии, в генетических исследованиях, а также для идентификации и таксономии микроорганизмов.

По физическому состоянию различают жидкие, плотные, сыпучие среды и гелеобразные.

Жидкие среды широко применяются для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, а также для поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Плотные среды используют для выделения чистых культур (получение изолированных колоний), в диагностических целях (установление морфологии колоний, особенностей роста на скошенном агаре и др.), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и в ряде других случаев.

Сыпучие среды применяются в промышленной микробиологии. К ним относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

Гелеобразные среды используют, как правило, для продолжительного хранения музейных чистых культур.

Уплотнение сред

Для уплотнения сред применяют агар-агар, желатину и кремнекислый гель.

Агар-агар используют особенно часто. Это сложный полисахарид,

получаемый из некоторых морских водорослей. Его выпускают в виде пластин, "стебельков" или порошка. Агар-агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. В воде агар-агар образует гели, плавящиеся при 100° и затвердевающие при температуре около 40°. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы практически при любой подходящей для их роста температуре. При остывании агар выделяет "конденсационную" воду. Чем меньше концентрация агара, тем больше выделяется воды. Чаще всего агар-агар добавляют к средам в количестве 2%. Если хотят получить более влажную среду, вносят 1,5%, а более плотную и сухую - 3%.

Следует отметить, что в слабокислых, нейтральных и слабощелочных средах агар-агар сохраняет способность образовывать гель после нескольких циклов плавления и затвердевания, а также после повторной стерилизации. Однако *в кислой среде при pH ниже 5,5, агар-агар при стерилизации частично гидролизует и поэтому после стерилизации часто не образует геля*. В этом случае агар-агар следует стерилизовать отдельно от среды в определенном объеме воды и добавлять в среду после стерилизации. Для этого стерильный водный агар-агар расплавляют на водяной бане и приливают при постоянном перемешивании к стерильной, предварительно подогретой среде.

Желатина - это белок, получаемый путем вываривания костей и хрящей животных. Образующий желатиной гель плавится при температуре 23°-26°, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30°-37°). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, выделяющимися некоторыми микроорганизмами в среду. Эти свойства желатины сильно ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства. Желатину используют, главным образом, для выявления протеолитической активности микроорганизмов, а также для получения "гигантских" и глубинных колоний дрожжей с целью их идентификации. В первом случае употребляют мясо-пептонную, а во втором - суловую желатину.

Кремнекислый гель (силикагель) используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава, поскольку он является веществом неорганической природы.

Осветление сред

Осветленные агаризованные или желатиновые среды необходимы в диагностических исследованиях и для получения хорошо видимых изолированных колоний анаэробных микроорганизмов. В ряде случаев прозрачную среду можно получить, отфильтровав ее от осадка через вату.

Когда этого бывает недостаточно, среды осветляют с помощью белков куриных яиц. Белок свертывается и адсорбирует все взвешенные в среде частицы. Среду быстро отфильтровывают в горячем виде через вату. При этом лучше всего пользоваться специально подогреваемыми подставками для воронок, которые предотвращают застывание среды во время фильтрования.

Синтетические агаризованные среды, внесение белка в которые нежелательно, осветляют следующим образом. Среду, налитую в химический стакан, автоклавируют и оставляют после стерилизации в закрытом автоклаве на 10-12 ч. При таком медленном остывании среды все взвешенные частицы оседают на дно. Застывшую агаризованную среду извлекают из стакана. Верхнюю, прозрачную часть среды срезают, помещают в колбу и вновь стерилизуют.

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется *культивированием* (лат. *cultivare* - выращивание), а развившиеся микроорганизмы - *культурой*. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензии, осадок или пленку, при развитии в плотной среде - колонии. Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения культуры называется *посевом*, или *инокуляцией*. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называется *пересевом*, или *пассированием* (лат. *passage* - чередование). Культивирование при определенной температуре называется *инкубацией*, или *инкубированием* (лат. *incubation* - выращивание при искусственно созданной температуре). Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде: в пробирках, колбах или чашках Петри. В пробирках и колбах микроорганизмы культивируют как в жидких, так и в плотных средах. В чашках Петри (двойные чашки) микроорганизмы культивируют лишь на плотных средах. Эти чашки имеют высоту ~ 1,5 см, диаметр ~ 8-10 см (диаметр крышки несколько больше, чем диаметр нижней половины чашки).

Одна из особенностей микроорганизмов - их необычайная зависимость от условий окружающей среды. Из-за малых размеров клеток микроорганизмы тесно контактируют с окружающей средой и реагируют на её изменения больше, чем другие живые существа. При этом наиболее существенное влияние оказывают набор и соотношение компонентов питательной среды, кислотность среды (pH), окислительно-восстановительные условия (*Eh*), аэрация, температура, влажность, свет и др. факторы. Изменение того или иного фактора существенно влияет на рост и обмен веществ микроорганизмов, т.к. их развитие возможно

лишь в определенных пределах каждого фактора, причем эти пределы неодинаковы для представителей различных групп.

Соотношение компонентов питательной среды

Необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов концентрации питательных веществ могут заметно различаться. Чем больше готовых соединений должен получать организм извне, тем ниже уровень его биосинтетических способностей. Поэтому среди микроорганизмов различают *автотрофы* и *гетеротрофы*. Наибольшая степень гетеротрофности выражена у *облигатных внутриклеточных паразитов*, т.е. организмов, которые могут жить только внутри других живых клеток. Такой образ жизни привел к редукции у них ряда метаболических путей и полной зависимости от метаболизма клетки хозяина. Формы, способные расти при создании подходящих условий вне клетки хозяина, называются *факультативными паразитами*. Группы гетеротрофов, которые не зависят от других организмов, но нуждаются в богатых органических средах, называются *сапрофитами*. При высоких концентрациях органических веществ в среде преимущественно будут развиваться *копиотрофы*, а при низких - *олиготрофы*. Иногда некоторые организмы могут расти на простых средах, но при этом они нуждаются в каком-либо одном органическом соединении из группы витаминов, аминокислот или азотистых оснований. Такие организмы называются *ауксотрофами*, в отличие от *прототрофов*, синтезирующих все необходимые органические соединения из основного источника углерода.

*,

Г

Активная кислотность среды (рН)

ш

«

Микроорганизмы по-разному относятся к активной кислотности среды. Некоторые могут развиваться в широких пределах рН, развитие других приурочено к более узкой зоне, и даже небольшие изменения данной величины заметно влияют на их рост и обмен веществ. Для каждого микроорганизма имеется своя оптимальная зона рН, в пределах которой он может нормально развиваться. Многие бактериальные формы (*нейтрофилы*) тяготеют к нейтральной среде (рН * 7,0), хотя многие грибы и некоторые бактерии предпочитают слабокислые или кислые среды, такие организмы называются *ацидофилами*, в отличие от *алкалофилов*, которые развиваются в щелочных условиях.

В большинстве случаев микроорганизмы изменяют рН среды, в которой они развиваются. Это связано с потреблением ими определенных компонентов среды или с образованием каких-либо продуктов жизнедеятельности. Такие изменения неблагоприятны для клеток и тормозят развитие культур. Поэтому при выращивании микроорганизмов в лабо-

раторных условиях в среды вводят буферные растворы или нейтрализующие вещества, которые не препятствуют развитию микроорганизмов.

Окислительно-восстановительный потенциал (E_h)

Развитие бактерий, как правило, сопровождается снижением окислительно-восстановительного потенциала среды. Особенно это заметно при росте анаэробов, интенсивное размножение которых происходит при низких значениях E_h . В противном случае их деление задерживается, а размеры, особенно длина, заметно увеличиваются.

Для роста анаэробных бактерий необходимо исключить доступ в среду кислорода. С этой целью используют различные приемы, например, применяют высокий слой среды, загущают среду путем добавления 0,2-0,3% агар-агара, кипятят ее перед посевом и т.д. Часто указанные приемы комбинируют друг с другом. Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для бактерий действие кислорода внесением большого количества посевного материала или прибавлением к феде восстановителей, снижающих окислительно-восстановительный потенциал (E_h).

Аэрация

й -

Аэрация среды также оказывает влияние на развитие микроорганизмов. облигатные аэробы не могут развиваться без доступа молекулярного кислорода, но пределы аэрации для этих организмов бывают разные. Существует несколько способов культивирования аэробных микроорганизмов: в тонком слое среды, при продувании воздуха через среду или при постоянном перемешивании среды.

Поверхностное культивирование на плотных и жидких средах.

В этом случае микроорганизмы развиваются на поверхности среды и получают кислород непосредственно из воздуха. Поэтому при поверхностном культивировании стараются увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном: чашки Петри, колбы Виноградского, матрацы. На жидких средах аэробные микроорганизмы растут в виде пленок, обычно достаточно плотных. Факультативные аэробы развиваются также и в толще жидкой среды, образуя более или менее равномерную муть, хлопья и т. п. Для них характерны менее плотные пленки, чем для облигатных аэробов. Поверхностное культивирование применяется в лабораториях и в промышленности.

Глубинное культивирование в жидких средах приобретает все большее значение в лабораторной практике и в про-

мышленности. Если микроорганизмы выращиваются в толще среды, то они могут пользоваться только растворенным в воде кислородом. Когда он потреблен, для продолжения развития необходимо поступление новой порции. Поэтому возможность и интенсивность роста аэробных микроорганизмов при глубинном культивировании определяется интенсивностью доставки кислорода к клеткам. При этом важно учитывать степень аэробности микроорганизмов, так как разным аэробам требуется неодинаковое количество кислорода для оптимального развития. Для каждого организма нормы аэрации подбирают экспериментально. Наибольшее распространение получило выращивание микроорганизмов с перемешиванием, которое осуществляют на качалках. Чем больше скорость перемешивания культуры, тем выше насыщение среды кислородом. Кроме того, на одной и той же качалке можно достигнуть различной аэрации, применяя неодинаковые объемы среды или используя колбы с отбойниками, которые интенсивно разбрызгивают среду и увеличивают поверхность соприкосновения ее с воздухом.

Способы культивирования анаэробных микроорганизмов

Выращивание анаэробов более сложно, чем культивирование аэробных микроорганизмов, так как они должны быть изолированы от доступа воздуха. Для этого используют различные приемы: механическую защиту микроорганизмов от воздуха, удаление кислорода из окружающей атмосферы и среды.

Механическая защита микроорганизмов от воздуха осуществляется применением высокого слоя или загущением сред, выращиванием в толще агаризованной среды.

Удаление кислорода из окружающей атмосферы и среды осуществляется кипячением среды, откачиванием воздуха непосредственно из сосудов для культивирования, выращиванием в анаэроstats, замещением воздуха азотом или аргоном, удалением кислорода химическим способом.

Температура

Микроорганизмы различаются по своему отношению к температуре. Есть микроорганизмы, развивающиеся в пределах от 0° до 20°С. Их называют психрофилами. Большинство микроорганизмов развиваются при более высоких температурах. Для них оптимальна температура 25-37°С, а верхняя граница - примерно 38-45°С. Такие микроорганизмы называются мезофилами. Существует особая группа теплолюбивых форм - термофилов. Оптимальная температура их роста 45-65°С, верхний предел выше 100°С. Отклонение температуры от оптимума неблагоприятно влияет на развитие микроорганизмов. Поэтому их выращи-

вают в **термостатах** или специальных **термостатированных комнатах**, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура. Двери термостата или термостатированной комнаты нельзя держать долго открытыми во избежание охлаждения камер.

Влажность

Жизнь микроорганизмов возможна только во влажных условиях. Для бактерий необходима капельножидкая вода, так как питательные вещества проникают в клетку только в растворенном состоянии. Минимальное содержание свободной воды, при котором еще возможно развитие, для большинства бактерий равно примерно 20%. При культивировании в жидких средах проблема поддержания влажности отпадает. Плотные агаризованные среды всегда содержат некоторое количество капельножидкой воды. Она бывает заметна в виде более или менее обильного конденсата. Однако при длительном хранении культур на плотных средах при комнатной температуре и даже в холодильнике среды подсыхают, и это может привести к гибели микроорганизмов. Поэтому необходимо производить регулярные своевременные пересевы культур, не допуская подсыхания сред. Если предполагается длительное культивирование в термостате, то чашки или пробирки лучше всего поместить во влажную камеру, т.е. в закрытый сосуд, где имеется сосуд с водой. Некоторые грибы могут расти на твердых субстратах без капельножидкой воды, но во влажной атмосфере.

Свет

Подавляющему большинству микроорганизмов свет не нужен. Прямые солнечные лучи отрицательно влияют на развитие многих микроорганизмов. Поэтому микроорганизмы культивируют в неосвещенных термостатах. Микроорганизмы, использующие в процессах обмена веществ энергию света, как уже указывалось, выращиваются при освещении. Для освещения обычно применяют лампы накаливания мощностью 75-100вт. При культивировании водорослей можно использовать и люминесцентные лампы.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПОСУДЫ

Стерилизация - один из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово "стерилизация" в переводе с латинского означает обеспложивание. В микробиологии под стерилизацией понимают гибель всех живых микроорганизмов. Микробиологи стерилизуют среды, посуду, инструменты и другие необходимые предметы,

чтобы не допустить развития посторонней микрофлоры в исследуемых культурах. Стерилизация питательных сред и посуды - обязательный момент в работе при выполнении всех задач практики.

Существуют следующие способы стерилизации.

Термическая стерилизация:

- прокаливание в пламени,
- стерилизация горячим воздухом,
- стерилизация насыщенным паром под давлением

(автоклавирование),

- дробная стерилизация (тиндализация).

Холодная стерилизация:

- фильтрованием,
- ультрафиолетовыми лучами.

Использование одного из этих способов стерилизации зависит от возможностей, целесообразности, физических свойств и химического состава стерилизуемого материала, от цели исследования. Следует помнить, что прокаливание в пламени и автоклавирование позволяют провести наиболее полную и надежную стерилизацию, однако не все материалы и среды могут выдержать открытое пламя, высокое давление и высокую температуру, не подвергаясь при этом каким-либо нежелательным изменениям. Поэтому целесообразно осваивать разные способы уничтожения микроорганизмов.

Стерилизация в пламени спиртовки или газовой горелки

В пламени спиртовой или газовой горелки стерилизуют металлические инструменты: бактериологические петли, ножницы, скальпели, пинцеты, иглы и т.п. При пересевах культур и разливе сред этим способом стерилизуют ватные пробки и стеклянные предметы: пипетки, шпатели и горлышки пробирок, колб, бутылок, ферментёров, т.п. В пламени погибают и клетки, и споры микроорганизмов. Такой способ получил название прокаливания или фламбирования.

Стерилизация горячим воздухом

Перевязочный материал (вату, марлю, х/б ткань), фильтровальную бумагу, металлические инструменты и стеклянные предметы, а также некоторые сыпучие среды (песок, почву) стерилизуют горячим воздухом или сухим жаром. Стерилизация сухим жаром осуществляется в печах Пастера. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Устройство сушильного шкафа. Сушильные шкафы делают из тер-

мостойких материалов - обычно из металла и асбеста. Внутри шкафа имеются полки, а наверху - отверстие, в котором укрепляют термометр так, чтобы его ртутный шарик находился внутри шкафа на расстоянии 6-8см от верхней стенки, поскольку у стенки шкафа температура всегда значительно выше. Наверху есть также отверстие для вентиляции, которое при стерилизации закрывают. Поддержание необходимой температуры обеспечивается терморегулятором.

Подготовка посуды к стерилизации. Посуду перед стерилизацией тщательно моют, сушат и заворачивают в бумагу для сохранения стерильности после прогрева. Завернутые пипетки для предохранения бумаги от загрязнения и разрывов заворачивают по несколько штук вместе или помещают в специальные металлические или картонные пеналы. Шпатели обертывают по отдельности, а потом, как и пипетки, объединяют. Каждую чашку Петри лучше завертывать отдельно, хотя можно и вместе по 2-3 штуки. Колбы, пробирки и трубки Бурри закрывают ватными пробками.

Стерилизация. Перевязочный материал и инструменты заворачивают в плотную бумагу. Предметы, подготовленные к стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный прогрев предметов. Плотно закрывают дверцу шкафа и вентиляционное отверстие, включают нагревающее устройство. Отмечают время, когда температура в шкафу достигнет нужной величины. Продолжительность стерилизации зависит от температуры: при 150°C она длится 2 ч., при 165°C - в течение 1-1,5 ч., при 180°C-40мин., при 200°C - не более 10-15 мин. (при 170° бумага и вата желтеют, а при более высокой температуре обугливаются). Началом стерилизации считается тот момент, когда температура в печи достигает нужной величины. Если шкаф не снабжен терморегулятором, *необходимо все время следить за температурой, так как при её понижении посуда не простерилизуется, а при нагреве выше 180°C бумага и пробки начинают обугливаться.* По окончании стерилизации выключают нагревающее устройство.

ВНИМАНИЕ ! Шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нём не упадёт до полного охлаждения, так как холодный воздух, поступающий внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде. При разрыве оберточного материала простерилизованные предметы следует стерилизовать повторно, т.к. стерильность его нарушается.

Простерилизованную посуду хранят в закрытом, защищенном от пыли месте. Развёртывают ее непосредственно перед использованием.

Стерилизация насыщенным паром под давлением

Автоклавировать можно питательные среды, посуду, металлические инструменты, перевязочные материалы, одежду и др. предметы, которые не теряют своих свойств и не изменяются при повышенном давлении и температуре выше 100°C. Этот способ основан на прогревании субстрата и предметов насыщенным паром при давлении выше атмосферного. Когда давление пара повышается, возрастает его температура (см. табл.).

Таблица

Температура насыщенного пара при различных давлениях

Давление, (атм.)		Температура, С°
<i>нормальное</i>	<i>добавочное</i>	
1,0		100
1,0	0,5	112
1,0	1,0	121
1,0	1,5	128
1,0	2,0	134

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает надежность стерилизации: при автоклавировании погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Автоклавирование проводят при различных режимах. Когда указывают режим стерилизации в единицах давления: 0,5; 1,0; 2,0 атм., - имеют в виду дополнительное давление. Условия повышенного давления пара создают в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах - автоклавах.

Устройство автоклава. Автоклавы бывают различной конструкции, но принципиальное устройство любого автоклава одно и то же.

Это металлический двустенный котел, способный выдержать высокое давление. Внутренняя часть котла является стерилизационной камерой, в которую помещают стерилизуемый материал. Стерилизационная камера снабжена краном для выхода воздуха, манометром для определения давления пара и предохранительным клапаном для выхода пара при повышении давления сверх необходимого и для предотвращения разрыва автоклава. Пространство между стенками, называемое "рубашкой", или водопаровой камерой, заполняется через воронку водой (лучше дистиллированной, чтобы не образовалась накипь) до определенного уровня, который отмечен на специальной водомерной трубке. В верхней части внутренней стенки "рубашки" имеются отверстия, через которые пар поступает в стерилизационную камеру. Для создания герме-

тичности автоклав плотно закрывается массивной крышкой с резиновой прокладкой.

Подготовка сред к стерилизации. Поскольку высокое давление накладывает определенные ограничения при стерилизации питательных сред, необходимо их правильно подготовить.

Среды, предназначенные для стерилизации в автоклаве, наливают не выше половины высоты сосуда. Сосуды закрывают ватными пробками, которые предохраняют среду от заражения микроорганизмами из воздуха, а затем бумажным колпачком. *Поэтому пробки должны быть достаточно плотными, с равномерным распределением волокон ваты. Однако слишком плотные пробки делать не следует, так как они затрудняют снабжение культур воздухом. Нельзя обертывать пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, целлофаном или другими материалами, не пропускающими пар. Пар должен обязательно проникать через пробку в сосуд, иначе среды не нагреются до нужной температуры и не простерилизуются.*

Автоклавирование. В водопаровую камеру наливают воду. В стерилизационную камеру на специальную решетку помещают стерилизуемый материал. Предметы следует размещать не слишком плотно, так как пар должен свободно проходить между ними, иначе они не нагреваются до необходимой температуры и могут остаться нестерильными. Загрузив стерилизационную камеру, плотно закрывают и завинчивают крышку автоклава, открывают кран, соединяющий камеру с наружным воздухом, и включают нагревающее устройство. Автоклавы нагреваются электричеством или газом. Отмечают время, когда из автоклава через кран начнет выходить пар. Пар вытесняет воздух, находящийся в автоклаве. Необходимо, чтобы из автоклава был удален весь воздух, так как при одном и том же давлении температура чистого пара выше температуры смеси пара и воздуха и, следовательно, губительное действие чистого пара на клетки микроорганизмов значительно сильнее. Пар выпускают в течение 15-20 мин, но не более, иначе в автоклаве останется мало воды и он может испортиться.

В крупногабаритных производственных автоклавах пар отводится в канализацию. У лабораторных автоклавов пар отводят в сосуд с водой через резиновый шланг, надетый на кран. После вытеснения воздуха закрывают кран и по манометру следят за повышением давления пара. На манометре обозначается дополнительное давление, которое создается в автоклаве сверх атмосферного. Когда стрелка доходит до указателя необходимого давления и, следовательно, температура пара достигает соответствующего значения, поддерживают давление на этом уровне необходимое время, регулируя нагрев. Имеются автоклавы с автоматическим регулированием режима.

Как только истечет время стерилизации, нагревание автоклава пре-

крашают. Необходимо дождаться, когда давление в автоклаве сравняется с атмосферным, т.е. стрелка манометра упадет до 0. После этого открывают кран, выводящий пар.

ВНИМАНИЕ ! *Преждевременное открывание крана недопустимо, так как нагретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают. При этом ватные пробки смачиваются и иногда выталкиваются из сосуда, что нарушает стерильность сред. После стерилизации среды выдерживают 2-3 суток в термостате при 30°C для проверки стерильности. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново.*

Режимы стерилизации сред. *Температура и длительность автоклавирования определяются прежде всего составом питательной среды. Субстраты, содержащие вещества, не выдерживающие нагревание до 120°C, стерилизуются при 0,5 атм. Молоко, дрожжевой автолизат, дрожжевую воду и среды с желатиной стерилизуют при 0,5 атм. в течение 15 мин. Среды, содержащие сахара и витамины, например пивное сусло или соки, стерилизуют при 0,5 атм. 20-30 мин. Мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар автоклавируют при 1 атм. 20-30 мин, картофельную среду и почвенную вытяжку - при 1,5 атм. 30 мин и т.д.*

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать pH среды. *В случае кислой реакции среды при автоклавировании могут подвергнуться гидролизу входящие в ее состав полимеры. Так, если pH среды ниже 6,5-6,0, то происходит пептонизация желатины и среда после стерилизации не застывает. При pH ниже 5,0 частично гидролизуются и теряет способность образовывать гель агар-агар. Если среда щелочная, то при стерилизации выпадают в осадок соли железа, карамелизуются и становятся недоступными для микроорганизмов сахара.*

Чтобы избежать этих явлений, среды, предназначенные для культивирования кислотолюбивых или щелочелюбивых микроорганизмов, стерилизуют при нейтральном значении pH и только после автоклавирования подкисляют или подщелачивают. Кроме того, растворы ряда компонентов часто стерилизуют отдельно при таком pH и в таком режиме, при которых они не изменяются, а затем стерильно добавляют в среды в нужном количестве.

Дробная стерилизация (тиндализация)

Для сред, портящихся под действием температур выше 100°C, применяется дробная стерилизация. Этот прием был введен английским ученым Тиндалем. Принцип тиндализации заключается в том, что нагревание среды или ее компонентов проводят при нормальном давлении несколько раз и в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорам. Прогревание осуществляют в парах кипящей воды

или, как говорят, **текучим паром** в текучепаровом аппарате Коха или в автоклаве с незавинченной крышкой и открытым выпускным краном. Время прогревания отмечается с момента энергичного выделения пара и продолжается по 30 мин ежедневно в течение 3 дней.

Кипятильник Коха представляет собой металлический цилиндр, обычно покрытый теплоизолирующим слоем, чаще всего асбестом. Внутри цилиндра находится сетчатое ведро или подставка на ножках, куда помещают стерилизуемый материал и прикрывают его клеенкой для защиты от конденсационной воды. На дно цилиндра наливают воду так, чтобы уровень ее не доходил до дна подставки. Кипятильник закрывают крышкой, в которой имеется отверстие для выхода пара, и нагревают с помощью газовой горелки или электричества.

В промежутках между прогреваниями среды помещают на сутки в термостат на 30° С для проращивания спор. Практическое значение тиндализации в настоящее время весьма ограничено, так как между прогреваниями некоторые споры могут не прорасти, а часть появившихся вегетативных клеток может вновь образовать споры и в таком виде противостоять действию высокой температуры. Кроме того, этот метод требует большой затраты времени.

Стерилизация фильтрованием

Стерилизация фильтрованием применяется в тех случаях, когда субстраты не выдерживают нагревания, в частности для сред, содержащих белки, для сывороток, некоторых антибиотиков, витаминов, летучих веществ, например некоторых углеводов. Этот прием довольно широко используется для стерилизации культуральной жидкости, когда необходимо освободить ее от клеток микроорганизмов, но сохранить все содержащиеся в ней продукты обмена в неизменном виде.

Способ заключается в фильтровании жидкостей через специальные фильтры, имеющие мелкопористые перегородки и поэтому задерживающие клетки микроорганизмов. При этом здесь имеет место не только механическая задержка, но и адсорбция микроорганизмов на стенках (поверхностях), ограничивающих поры, вследствие того что большинство микроорганизмов в водных суспензиях несет на своей поверхности отрицательный заряд, а фильтры изготавливаются из положительно заряженных материалов. Если изготовить фильтр из электроотрицательного материала, например из обожженного гипса или алебаstra, то многие микроорганизмы будут легко проходить через него. Поры фильтров должны быть достаточно мелкими не только затем, чтобы обеспечить механическую задержку клеток, но и для того, чтобы микроорганизмы оказались в сфере действия электрического заряда стенок. Диаметр пор определяет область применения фильтров. Фильтры с относительно

крупными порами применяются для очистки (фильтрования) воды от планктонных организмов и отделения более крупных микроорганизмов от мелких. Чем мельче поры фильтра, тем более пригоден он для стерилизации. Пригодность фильтров для стерилизации испытывают путем пробной фильтрации через них суспензии какого-либо мелкого микроорганизма, например *Pseudomonas pyocyaneum*, *Serratia marcescens*. Для проверки на стерильность фильтрат в большом количестве высевают на питательную среду. Если в течение пяти дней тест-организм не вырастет, фильтры могут быть использованы для стерилизации. Как правило, бактериальные фильтры пропускают вирусы и бактериофаги.

Бактериальные фильтры изготавливают из различных материалов. Они имеют различную форму и разный диаметр пор, обычно указанный на упаковке фильтра или в прилагаемом паспорте. Нередко фильтры выпускают под определенными номерами и марками. Каждый номер или марка соответствуют определенному размеру пор. В настоящее время для стерилизации наиболее широко используются два типа фильтров: мембранные фильтры и фильтры Зейтца.

Мембранные фильтры готовят из коллодия, апетата, целлюлозы и других материалов. Они представляют собой диски, напоминающие бумажные, толщиной около 0,1 мм. Отечественная промышленность выпускает мембранные фильтры, которые в зависимости от размеров пор обозначаются NN 1, 2, 3, 4, 5 и средний диаметр пор которых составляет 0,35; 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 мк соответственно.

Фильтры Зейтца - это плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. С увеличением содержания целлюлозы пористость фильтра возрастает. Отечественные асбестовые фильтры обозначаются марками Фг и СФ. Стерилизующими являются фильтры марки СФ. Помятые асбестовые пластинки, а также пластинки с надломами и трещинами для работы непригодны.

Кроме того, для стерилизации применяются фильтры, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка ("свечи" Шамберлана), из инфузорной земли ("свечи" Беркефельда) и из других материалов. Свечи Шамберлана различаются по размерам пор и степени пористости. Фильтры с обозначением L наиболее пористые. Они пропускают все бактерии. Свечи L₆ и L₇ задерживают клетки только крупных бактерий. Свечи L₈ задерживают споры столбняка и палочку дифтерии. Затем в порядке уменьшения размеров пор свечи обозначают от L₉ до L₁₂. Свечи, предназначенные, главным образом, для фильтрации воды, обозначаются F и V, причем по своей пористости свечи F соответствуют L₉, а свечи V - L₁₂. Форма свеч Шамберлана может быть разной. Свечи Беркефельда имеют обозначения W, N и V, что соответствует диаметрам пор 3-4, 5-7 и 8-12 мкм. Работа с бактериальными фильтрами подробно описана в соответствующих практических руководствах.

Следует учитывать, что состав жидкостей, прошедших через бактериальные фильтры, может меняться вследствие адсорбции на фильтрах ряда веществ, таких, например, как некоторые жирные кислоты, белки, полисахариды и др. В результате среды могут оказаться непригодными для культивирования данных микроорганизмов. Возможность и степень адсорбции веществ на фильтре определяется химической природой фильтра, размерами его пор, временем фильтрования.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами и газами

Предметы, изготовленные из термолабильных пластмасс, например центрифужные пробирки, стерилизуют УФ-лучами. Время облучения устанавливают экспериментально. Оно зависит от мощности используемой бактерицидной лампы и расстояния между лампой и объектом. После облучения предметы до использования следует хранить в стерильной посуде.

Предметы из термолабильных пластмасс (одноразовые медицинские инструменты, одноразовая лабораторная посуда и т.п.), космические корабли, заполненные исследовательской электронной аппаратурой, одномоментная обработка большого количества одежды в очаге эпидемии могут быть простерилизованы газами: окисью этилена в смеси с СО₂ или бромистым метилом и некоторыми другими способами.

Неполное уничтожение микроорганизмов

В бытовой практике не всегда требуется полное уничтожение микрофлоры, бывает вполне достаточно удаление лишь патогенных представителей. В этих случаях достаточно провести дезинфекцию или пастеризацию.

Дезинфекция - это методы и средства уничтожения болезнетворных микроорганизмов на путях передачи от источника инфекции к здоровому организму. Основная задача дезинфекции - прерывание механизма передачи инфекции обеззараживанием различных объектов внешней среды. Выбор дезинфицирующего вещества, концентрация его раствора, соотношение между количеством дезинфицирующего вещества и обеззараживаемым материалом, а также продолжительность срока дезинфекции устанавливают в зависимости от конкретных условий, учитывая в первую очередь устойчивость обеззараживаемых микроорганизмов, степень предполагаемого загрязнения, состав и консистенцию материала, в котором они находятся.

Средства, применяемые для дезинфекции, подробно описаны в занятии N1.

Пастеризация - это однократное нагревание жидкостей или пище-

вых продуктов (молоко, ягодные и фруктовые соки, вино, пиво и др.) обычно до 60-75°C в течение 15-30 мин или при 80°C в течение 10-15 мин. Иногда материал нагревают до 95°C не более чем на 1 мин и сразу же охлаждают. Пастеризация в подавляющем большинстве случаев не обеспечивает стерильности субстрата, так как при таких способах обработки погибает только большинство беспоровых форм, а споры микроорганизмов сохраняют свою жизнеспособность. Режим пастеризации определяется устойчивостью материала к термической обработке, его предполагаемой зараженностью микроорганизмами и целью работы.

В микробиологической лаборатории пастеризацией сред или посевного материала часто пользуются для выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов и для выявления способности микроорганизмов к образованию спор. Пастеризацию в лаборатории проводят в ультратермостате или на водяной бане.

ОБОРУДОВАНИЕ: микроанаэроостаты, эксикатор с крышкой, чистые чашки Петри, пробирка, пипетки на 1мл, шпатель Дригальского.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: вата для изготовления пробки, лист чистой бумаги и полоски бумаги, кусочек марли, нитки, ножницы, канцелярская скрепка.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Ознакомиться устройством аппарата Коха и микроанаэроостатом.
 2. Подготовить для стерилизации 2 чашки Петри, одну пипетку на 1 мл, шпатель Дригальского.
 3. Изготовить две ватные пробки для пробирки.
 4. Сдать лаборанту подготовленную посуду для стерилизации и изготовленные пробки.
 5. Записать в тетради условия стерилизации питательной среды - рыбно-пептонного агара (тиндализацией) и посуды (сухим жаром).
 6. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 7. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

При подготовке посуды к стерилизации её необходимо завернуть в бумагу так, чтобы она не разворачивалась.

Для того чтобы завернуть пипетку в бумагу, необходимо:

1.В концы пипеток, которые берутся в рот, вставить небольшие ватные тампоны, не более чем на 1см от конца пипетки.

2.Каждую пипетку завернуть отдельно в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см, причем обмотку начинают с рабочего конца пипетки, которым набирают исследуемый материал. Сначала тщательно закрывают кончик пипетки так, чтобы воздух не контактировал с ее отверстием.

3. Постепенным движением бумаги по спирали закрутить пипетку в бумагу и закончить обмотку у конца с тампоном. Бумага должна плотно охватывать пипетку.

4. На поверхности бумаги сделать пометку об объёме пипетки.

Вопросы для самопроверки

1. Как классифицируют питательные среды по химическому составу, физическому состоянию, по использованию?
2. В каких случаях используют жидкие среды, а в каких плотные? Чем уплотняют питательные среды в микробиологии и почему?
3. Что называется культурой микроорганизмов? Что такое культивирование и инкубирование? Что подразумевают под посевом и пассированием?
4. Какие факторы внешней среды влияют на рост и размножение микроорганизмов? Каковы условия и способы выращивания анаэробных и аэробных форм?
5. Перечислите условия, которые необходимо учитывать при выращивании микроорганизмов в лабораторных условиях.
6. Что такое стерилизация, дезинфекция и пастеризация?
7. Перечислите способы стерилизации. Чем они отличаются между собой?
8. Чем отличается стерилизация от дезинфекции и пастеризации? Чем отличается пастеризация от дезинфекции?

№ 6

КОЛЛОКВИУМ по теме: *Отличительные особенности прокариотических организмов от эукариотических. Основные методы микробиологии. Современные направления в таксономии микроорганизмов.*

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закреплением проверка лекционного материала и теоретического материала практикума.

Вопросы для подготовки

1. Цели, задачи и методы основных направлений современной микробиологии.
2. Морфологические отличия прокариотических клеток от эукариотических.
3. Функционально-биохимические отличия прокариот от эукариот.
4. Отличие прокариот от эукариот на физиологическом уровне.
5. Отличие прокариот от эукариот на генетическом и молекулярном уровнях.

6. Особенности строения и функции клеточной стенки прокариот, в отличие от эукариот.
7. Строение и функции надоболочечных структур, фимбрий и шипов.
8. Особенности механизмов движения прокариот, в отличие от эукариот.
9. Особенности размножения микроорганизмов. Отличия периодического культивирования от непрерывного.
10. Задачи и методы хемотаксономии. Достоинства и недостатки этого направления.
- П. Задачи и методы нумерической таксономии. Достоинства и недостатки данного метода.
12. Задачи и методы генотаксономии, её достоинства и недостатки.
13. Вопросы, сформулированные для самопроверки после каждого заня-

Библиографический список

1. **Лабинская А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 с.
2. **Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г.** Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1971. 222 с.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1976. 307с.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Занятие № 1	МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ. МИКРОСКОПИРОВАНИЕ. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА. ОСВЕЩЕНИЕ ПРЕПАРАТА ПО КЁЛЕРУ	4
Занятие № 2	ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДАМИ "РАЗДАВЛЕННАЯ КАПЛЯ", "ВИСЯЧАЯ КАПЛЯ" И "ОТПЕЧАТОК". ПРАВИЛА РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫРОСШИХ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ	17
Занятие № 3	ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ	22
Занятие № 4	ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ И ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ	28
Занятие № 5	ПРИНЦИПЫ СОСТАВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, УСЛОВИЯ И СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ИНСТРУМЕНТОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД	34
Занятие № 6	КОЛЛОКВИУМ	54