

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ**

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

Д.Г.ДЕРЯБИН

# **ЦИТОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ**

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом  
Государственного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2007

ББК 28. 4 я7  
Д 36  
УДК 579 (07)

Рецензент  
доктор медицинский наук Ю.А.Брудастов

Д 36      **Дерябин Д.Г.**  
**Цитология микроорганизмов: методические указания к лабораторному практикуму/Д.Г. Дерябин – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2007. – 51 с.**

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных занятий по дисциплине специализации «Цитология микроорганизмов» в 3 семестре по специальности 020209 – Микробиология.

ББК 28. 4 я7

© Дерябин Д.Г., 2007  
© ГОУ ОГУ, 2007

# Содержание

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Введение.....                                                                                                                                   | 5  |
| 1 Методы микроскопии.....                                                                                                                       | 6  |
| 1.1 Устройство светового микроскопа. Микроскопия в проходящем свете (метод светлого поля).....                                                  | 6  |
| 1.2 Приготовление и фиксация препаратов для световой микроскопии. Простые позитивные и негативные методы окрашивания. Понятие об иммерсии. .... | 9  |
| 1.3 Темнопольная и фазово-контрастная микроскопия.....                                                                                          | 12 |
| 1.4 Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия.....                                                                                            | 16 |
| 1.5 Электронная микроскопия.....                                                                                                                | 19 |
| 1.6 Сканирующая зондовая микроскопия.....                                                                                                       | 22 |
| 2 Строение бактериальных клеток.....                                                                                                            | 25 |
| 2.1 Сравнительный анализ прокариотических и эукариотических клеток.....                                                                         | 25 |
| 2.2 Окраска по Граму и ее использование для дифференциации бактерий с различным строением клеточной стенки.....                                 | 27 |
| 2.3 Капсулы бактерий и методы их выделения.....                                                                                                 | 30 |
| 2.4 Жгутики бактерий и методы их выявления.....                                                                                                 | 32 |
| 2.5 Нуклеоид бактериальной клетки.....                                                                                                          | 35 |
| 2.6 Рибосомы.....                                                                                                                               | 37 |
| 2.7 Система внутриклеточных мембран.....                                                                                                        | 40 |
| 2.8 Включения.....                                                                                                                              | 42 |
| 3 Деление бактерий.....                                                                                                                         | 45 |
| 4 Покоящиеся формы микроорганизмов .....                                                                                                        | 47 |
| 5 Литература, рекомендуемая для изучения темы.....                                                                                              | 50 |
| Приложение А.....                                                                                                                               | 51 |
| Вопросы к зачету по дисциплине «Цитология микроорганизмов».....                                                                                 | 51 |

## **Введение**

Дисциплина «Цитология микроорганизмов» изучается студентами специальности 020209 – Микробиология в 3-ем семестре как дисциплина специализации (Федеральный компонент ДС.Ф.01).

Дисциплина изучается в соответствии с учебным планом специальности 020209 с учетом ГОС ВПО (раздел 4 «Общие требования к обязательному минимуму содержания основной образовательной программы по специальности (ранее 012400) - Микробиология»), введенными в действие с 10.03.2000 г. Министерством образования Российской Федерации.

Основной целью преподавания дисциплины является освоение основных цитологических методов, применяемых к микроорганизмам (световая, фазово-контрастная, люминесцентная и электронная микроскопии); формирование развернутых представлений об организации и функции субклеточных структур прокариотов, а также их изменений при воздействии различных физических и химических факторов.

В органической связи с получением фундаментальных знаний по данной дисциплине важной целью ее изучения является формирование практических навыков проведения различных видов микроскопии, приготовления микроскопических препаратов, оценки результатов микроскопических исследований.

# 1 Методы микроскопии

## 1.1 Устройство светового микроскопа. Микроскопия в проходящем свете (метод светлого поля)

**Микроскоп** (от греч. *mikros* - малый и *skopeo* - смотрю) - оптический прибор для получения увеличенного изображения мелких объектов и их деталей, невидимых невооруженным глазом.

Первый из известных микроскопов был создан в 1590 году в Нидерландах потомственными оптиками **Захарием** и **Хансом Янсенами**, смонтировавшими две выпуклые линзы внутри одной трубки. Позднее **Декарт** в своей книге "Диоптрика" (1637) описал более сложный микроскоп, составленный из двух линз - плоско-вогнутой (окуляр) и двояковыпуклой (объектив). Дальнейшее же совершенствование оптики позволило **Антони ван Левенгуку** в 1674 г. изготовить линзы с увеличением, достаточным для проведения простых научных наблюдений и впервые в 1683 году описать микроорганизмы.

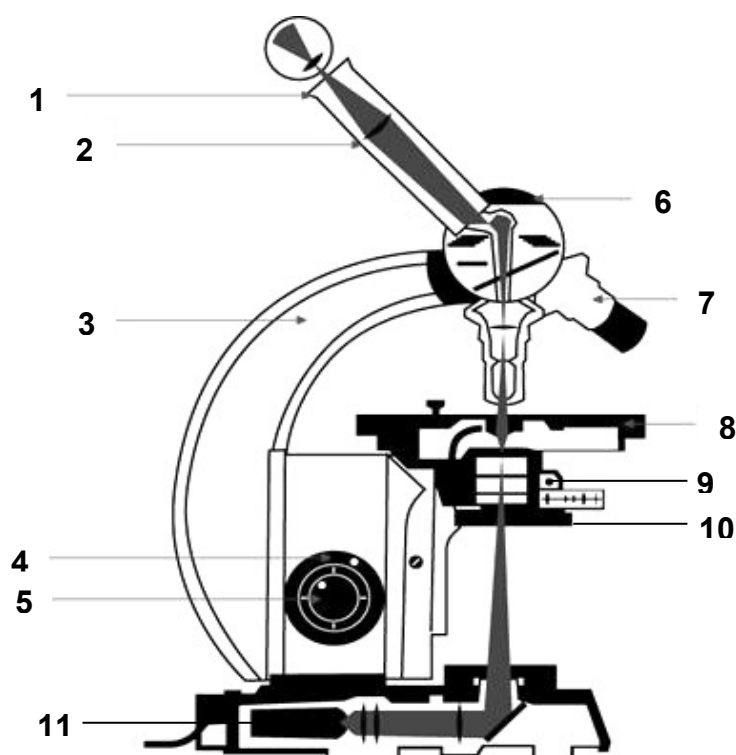
Современный микроскоп (рисунок 1) состоит из трех основных частей: оптической, осветительной и механической.

Основными деталями **оптической части** микроскопа являются две системы увеличительных линз: обращенный к глазу исследователя окуляр и обращенный к препарату объектив. **Окуляры** имеют две линзы, верхняя из которых называется главной, а нижняя собирательной. На оправе окуляров обозначают производимое ими **увеличение** ( $\times 5$ ,  $\times 7$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ ). Количество окуляров у микроскопа может быть различным, в связи с чем различают **монокулярные** и **бинокулярные** микроскопы (предназначены для наблюдения за объектом одним или двумя глазами), а также **тринокуляры**, позволяющие подключать к микроскопу системы документирования (фото- и видеокамеры). **Объективы** представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу, из которых передняя (фронтальная) линза производит увеличение, а лежащие за ней коррекционные линзы устраняют недостатки оптического изображения. На оправе объективов цифрами также указано производимое ими **увеличение** ( $\times 8$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ). Большинство моделей, предназначенных для микробиологических исследований, имеют в комплекте несколько объективов с разными степенями увеличения и поворотный механизм, предназначенный для их быстрой смены – **турель**, часто называемый «**револьверной головкой**».

**Осветительная часть** предназначена для создания светового потока, который позволяет осветить объект таким образом, чтобы оптическая часть микроскопа предельно точно выполняла свои функции. Осветительная часть в прямых микроскопа проходящего света расположена за объектом под объективом и включает в себя **источник света** (лампу и электрический блок питания) и **оптико-механическую систему** (конденсор, полевую и апертурную регулируемые диафрагмы). **Конденсор** состоит из системы линз, которые предназначены для собирания идущих от источника света лучей в одной точке – **фокусе**, которая должна находиться в плоскости рассматриваемого объекта. В свою очередь **диафрагма** расположена под конденсором и предназначена для регулиро-

вания (увеличения или уменьшения) потока лучей, проходящих от источника света.

**Механическая часть** микроскопа содержит детали, объединяющие описанные выше оптическую и осветительную части, а также позволяющие размещать и перемещать исследуемый препарат. Соответственно, механическая часть состоит из **основания** микроскопа и **держателя**, к верхней части которого прикрепляются **тубус** – полая трубка, предназначенная для размещения объектива, а также упомянутая выше револьверная головка. Ниже находится **предметный столик**, на который устанавливаются предметные стекла с исследуемыми образцами. Предметный столик может перемещаться в горизонтальной плоскости с использованием соответствующего устройства, а также вверх и вниз, что обеспечивает настройку резкости изображения с помощью **грубого (макрометрического)** и **точного (микрометрического) винтов**.



1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – держатель; 4 – винт грубой (макрометрической) настройки; 5 – винт точной (микрометрической) настройки; 6 – револьверная головка; 7 – объектив; 8 – предметный столик; 9 – конденсор; 10 – диафрагма; 11 – осветительная лампа.

Рисунок 1–Устройство современного светового микроскопа

**Цель работы – изучить устройство светового микроскопа.**

Методика выполнения работы.

Рассмотрите и изучите устройство светового микроскопа (на примере прямого бинокулярного микроскопа «Микмед-5»), назначение его основных деталей и узлов. Полученные знания оформите в виде таблицы 1.

Таблица 1

| Основные узлы и детали светового микроскопа | Оптическая часть | Осветительная часть | Механическая часть |
|---------------------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| Объектив                                    |                  |                     |                    |
| Окуляр                                      |                  |                     |                    |
| Источник света                              |                  |                     |                    |
| Диафрагма                                   |                  |                     |                    |
| Конденсор                                   |                  |                     |                    |
| Основание                                   |                  |                     |                    |
| Держатель                                   |                  |                     |                    |
| Тубус                                       |                  |                     |                    |
| Турель                                      |                  |                     |                    |
| Предметный столик                           |                  |                     |                    |
| Макрометрический винт                       |                  |                     |                    |
| Микрометрический винт                       |                  |                     |                    |

**Цель работы – освоить метод микроскопии в проходящем свете (метод светлого поля) на примере микроскопии дрожжевых клеток *Saccharomyces*.**

**Метод светлого поля** в проходящем свете применяется для изучения прозрачных объектов с неоднородными включениями (простейшие и бактерии в жидкостях, тонкие срезы растительных и животных тканей, тонкие полированные пластинки некоторых минералов). При выполнении данного вида микроскопии пучок лучей из осветительной системы проходит сквозь препарат и дает равномерно освещенное поле в плоскости изображения. В свою очередь элементы структуры препарата частично поглощают и отклоняют падающий на них свет, что и обуславливает появление изображения.

Для выполнения работы используйте взвесь пекарских дрожжей *Saccharomyces* в физиологическом растворе, которую нанесите на поверхность предметного стекла.

Техника микроскопии:

- 1) включите микроскоп в сеть и нажмите клавишу включения осветителя;
- 2) установите окуляр  $\times 10$  и объектив  $\times 40$ ;
- 3) полностью откройте диафрагму;
- 4) поместите препарат на предметный столик и закрепите его;
- 5) под наблюдением сбоку пользуясь макрометрическим винтом медленно поднимите препарат до уровня объектива, не касаясь его;
- 6) глядя в окуляр и пользуясь макрометрическим винтом, медленно опускайте предметный столик до появления объекта;
- 7) проведите окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его только в пределах одного оборота.

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 2, обозначив дрожжевые клетки и окружающий их фон.

Таблица 2

| Результаты микроскопии дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (метод светлого поля) | Обозначения |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                                                                    |             |

## 1.2 Приготовление и фиксация препаратов для световой микроскопии. Простые позитивные и негативные методы окрашивания. Понятие об иммерсии.

Исследование микробных клеток **в окрашенном состоянии** дает возможность наиболее четко различать их форму, взаимное расположение, а также прочие морфологические особенности

Общие принципы приготовления препаратов:

1) Первым этапом приготовления препарата является нанесение **исследуемого материала** на **предметное стекло**. Предметные стекла, употребляемые для приготовления препаратов, должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Для этого их обычно предварительно кипятят в 1 % растворе соды ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) в течение 15 мин, споласкивают водой, промывают в слабом растворе  $\text{HCl}$  и вновь хорошо споласкивают водой. Хранят стекла в сосудах (банках) с притертыми пробками в 96 % спирте, либо промытыми и вытертыми досуха.

При исследовании культур микроорганизмов, выращенных в жидких питательных средах, каплю исследуемого материала отбирают прожженной над пламенем горелки и остуженной о край пробирки бактериологической петлей, после чего круговыми движениями наносят на центр предметного стекла. При исследовании культур микроорганизмов, выращенных на плотных питательных средах, часть выросшей колонии бактериологической петлей переносят в каплю дистиллированной воды, предварительно нанесенной в центр предметного стекла, и тщательно размешивают до получения тонкого слоя. Возможным вариантом является также исследование микроорганизмов, извлекаемых непосредственно со слизистых оболочек и тканей человека или животных путем приготовления т.н. «мазков-отпечатков».

2) После высыхания препарата осуществляют его **фиксацию**. Наиболее распространенным способом является **фиксация жаром**, для чего держа стекло мазком вверх, его трижды проводят через пламя спиртовой или газовой горелки (Внимание! Во избежание перегрева препарата время фиксации не должно превышать 5-6 секунд, а время прямого воздействия пламени 2-х секунд). Другим способом является **химическая фиксация**: метиловым спиртом в течение 2-3 мин, этиловым 96 % спиртом в течение 10-15 мин, смесью равных объемов абсолютного спирта и эфира в течение 10-15 мин и т.д.

3) Третьим этапом является **окрашивание препаратов**. При этом возмож-



ными вариантами являются **простое** (ориентировочное) **окрашивание**, позволяющее выявлять только форму и взаимное расположение микроорганизмов, а также **сложное** (дифференциальное) **окрашивание**, выявляющее химические и тонкие структурные особенности микроорганизмов.

В свою очередь простые методы окрашивания могут быть подразделены на **позитивные** и **негативные**. В первом случае краситель связывается с телом бактериальной клетки, а окружающий ее фон остается прозрачным (неокрашенным). Во втором случае окрашивается фон, в то время как бактериальные клетки визуализируются как прозрачные структуры различных форм и размеров.

**Цель работы – овладение методами позитивного и негативного окрашивания дрожжевых клеток *Saccharomyces*.**

Методика выполнения работы.

Для выполнения работы используйте взвесь пекарских дрожжей *Saccharomyces* в физиологическом растворе. Приготовьте два идентичных мазка исследуемой культуры, которые окрасьте в соответствии с описанными ниже процедурами.

Позитивное окрашивание:

- 1) на поверхность предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры и фиксируют жаром;
- 2) на поверхность мазка наносят краситель – **щелочной раствор метиленового синего Леффлера** (состав: 3 г метиленового синего, 20 мл 96 % этилового спирта, 1 мл 1 % раствора КОН, дистиллированной воды 100 мл), выдерживают в течение 3-5 мин;
- 3) мазок промывают водой и высушивают на воздухе.

Негативное окрашивание:

- 1) на поверхность предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры в физиологическом растворе (не высушивают! не фиксируют!).
- 2) сразу после этого наносят туда же каплю туши и смешивают ее петлей с каплей исследуемой культуры.
- 3) ребром покровного стекла распределяют смесь по поверхности предметного стекла.
- 4) мазок высушивают на воздухе и после высыхания фиксируют над пламенем горелки, после чего промывают водой.

**Цель работы – овладение методом иммерсионной микроскопии.**

Важнейшими характеристиками любого микроскопа являются его общее увеличение и разрешающая способность. **Общее увеличение** микроскопа равно произведению увеличения его объектива и окуляра. Например, при увеличении окуляра равном  $\times 10$  и увеличении объектива равном  $\times 40$  общее увеличение будет равно 400. **Разрешающая способность** – другая важная характеристика микроскопа, определяющая качество и четкость формируемого изображения.

Под этим термином понимается наименьшее расстояние между двумя точками препарата, при котором они еще видны раздельно. Согласно дифракционной теории *Аббе*, линейный предел разрешения микроскопа ( $\sigma$ ) зависит от длины волны ( $\lambda$ ) освещающего препарат света и числовой апертуры ( $A$ ) микроскопа:

$$\sigma = \frac{\lambda}{2A} \quad (1)$$

В свою очередь под **апертурой** здесь понимается величина, рассчитываемая по формуле:

$$A = n \times \sin(\alpha / 2), \quad (2)$$

где  $n$  - показатель преломления той среды, в которой находится предмет и из которой исходят лучи,

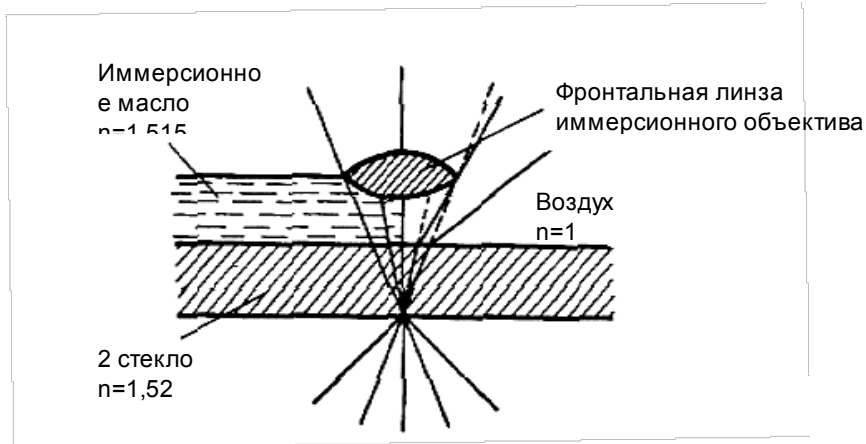
$\alpha$  - угол, составляемый крайними лучами, идущими из предмета и еще попадающими в объектив.

Если принять, что максимально возможное значение синуса угла единичное ( $A=1$ ), то при минимальной длине видимого света ( $\lambda=400$  нм) разрешающая способность микроскопа составит 200 нм (0,2 мкм).

Таким образом, **предел увеличения** светового микроскопа ограничивается не общим коэффициентом увеличения объектива и окуляра (их возможно сделать сколь угодно большими), а его разрешающей способностью.

Из выражения (1) также следует, что повысить разрешающую способность микроскопа можно двумя способами: либо уменьшая длину волны света, освещающего препарат, либо увеличивая апертуру объектива. Последнее достигается путем заполнения пространства между рассматриваемым предметом и объективом так называемой **иммерсионной средой** – прозрачным веществом с показателем преломления, близкими к стеклу (например, кедровым маслом с  $n=1,515$ ). В результате апертуры современных иммерсионных объективов достигают величин  $A=1,5$  с соответствующим увеличением разрешающей способности и полезного увеличения снабженных ими микроскопов.

Первые (водные) иммерсионные системы были созданы в 60-х годах XIX в. немецкими оптиками *Гартнаком* и *Мерцем*, а в 1878 г. *Аббе* совместно со *Стефенсоном* изготовлен масляный иммерсионный объектив (рисунок 2).



## Рисунок 2 – Ход лучей в иммерсионном объективе

Техника микроскопии:

- 1) включите микроскоп в сеть и нажмите клавишу включения осветителя;
- 2) установите окуляр  $\times 10$  и иммерсионный объектив  $\times 100$ ;
- 3) полностью откройте диафрагму;
- 4) поместите препарат, полученный при выполнении работы 1.2.2 на предметный столик и закрепите его;
- 5) нанесите на препарат каплю иммерсионного масла;
- 6) под наблюдением сбоку пользуясь макрометрическим винтом медленно поднимите препарат до уровня объектива, погрузив его в иммерсионное масло;
- 7) глядя в окуляр и пользуясь макрометрическим винтом, медленно опускайте предметный столик до появления объекта;
- 8) проведите окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его только в пределах одного оборота.

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 3, обозначив дрожжевые клетки и окружающий их фон.

Таблица 3

| Результаты микроскопии дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (позитивное окрашивание) | Результаты микроскопии дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (негативное окрашивание) |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                       |                                                                                       |

### 1.3 Темнопольная и фазово-контрастная микроскопия

Возможность наблюдения микроорганизмов в живом (неокрашенном) состоянии обеспечивается использованием темнопольной и фазово-контрастной микроскопии, требующих использования специальных конденсоров и позволяющих получать черно-белые изображения исследуемых микроорганизмов с возможностями изучения их формы, подвижности, деления и т.д.

**Темнопольная микроскопия** основана на **эффекте Тиндаля**, известным примером которого служит обнаружение пылинок в воздухе при освещении их узким лучом солнечного света. Данный вид микроскопии впервые был предложен австрийскими учеными **Р.Зигмонди** и **Р.Зидентопфом** в 1903 г. При его выполнении объект освещают не снизу, а сбоку, в результате чего прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают и поле зрения остается темным. Подобный тип освещения достигается использованием специального **темнопольного конденсора (параболоида или кардиоида)** с затемненной центральной частью. Кроме того, чтобы в объектив не попадали прямые лучи от

осветителя, апертура объектива должна быть меньше, чем апертура конденсора (для уменьшения апертуры в обычный объектив помещают диафрагму или пользуются специальными объективами, снабженными ирисовой диафрагмой). В свою очередь объект освещается косыми боковыми лучами и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате. Сказанное объясняет, почему при темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне (рисунок 3). Ограничениями же темнопольной микроскопии является то, что она позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучать его внутреннюю структуру.

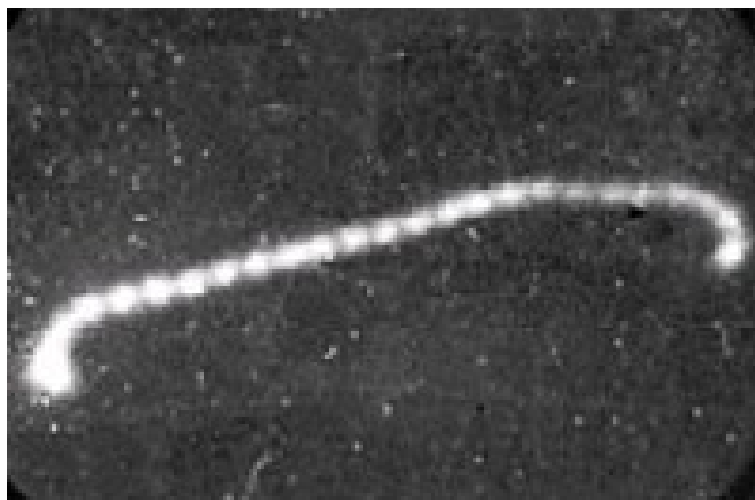


Рисунок 3 – Изображение лептоспиры, полученное с использованием темнопольной микроскопии

В основе метода **фазово-контрастной микроскопии**, также предназначенного для наблюдения микроорганизмов в живом (неокрашенном) состоянии лежит иной физический принцип, впервые предложенный **Ф.Цернике** в 1935 году (Нобелевская премия по физике, 1953 г.). Суть его заключается в том, что в обычных условиях при прохождении пучка света через неокрашенный объект, отличающихся от окружающей среды только по показателю преломления, изменяется лишь **фаза колебания световой волны**, не воспринимаемая человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным необходимо превратить фазовые изменения световой волны в **видимые амплитудные**, что достигается с помощью специального **фазово-контрастного устройства**. Основными деталями подобного устройства, которое может быть установлено на любом световом микроскопе, являются фазовоконтрастный конденсор и фазовый объектив. **Фазовоконтрастный конденсор** представляет собой револьверную конструкцию, в которой установлены **кольцевые диафрагмы**, обеспечивающие освещение препарата полным конусом света и соответствующие фазовым пластинкам в каждом из объективов. В свою очередь **фазовый объектив** отличается от обычных тем, что в их главном фокусе расположена **фазовая пластин-**

**ка**, имеющая форму кольца и получаемая нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. При этом установку освещения проводят так, чтобы весь свет, прошедший через кольцевидную диафрагму конденсора, в дальнейшем прошел через расположенное в объективе фазовое кольцо.

При изучении препарата весь свет, прошедший через его участки, в которых нет каких-либо объектов, без изменений пройдет и через фазовое кольцо, обусловив светлое изображение фона. В свою очередь свет, прошедший через имеющиеся в препарате частицы, например, бактериальные клетки, получит некоторое изменение фазы и, кроме того, разделится на два луча — недифрагированный и дифрагированный. **Недифрагированные лучи**, пройдя в дальнейшем через кольцевидную фазовую пластинку в объективе, получают дополнительный сдвиг фазы. **Дифрагированные лучи** пройдут мимо фазовой пластинки, и их фаза не изменится. В плоскости же полевой диафрагмы окуляра произойдет интерференция (наложение) дифрагированного и недифрагированного лучей, а так как они идут в разных фазах, произойдет их взаимное частичное гашение с уменьшением амплитуды. Благодаря применению этого метода микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов относительно фона резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (**позитивный фазовый контраст**).



Рисунок 4 – Изображение клеток *Bacillus cereus* на плотной питательной среде, полученное с использованием фазово-контрастной микроскопии

Фазовому контрасту присущ **эффект Гало** - появление светящегося ореола по контуру изображения объекта (рисунок 4), что затрудняет изучение свойств краевых структур наблюдаемых объектов, например, не позволяет точно замерять углы или расстояния. Для устранения данного недостатка используется вариант фазово-контрастной микроскопии — так называемый **«хоффмановский контраст»**. Другой разновидностью данного метода является **аноптальная микроскопия**, преимуществами которой являются большая разреша-

ющая способность с выявлением минимальных разностей плотности в неокрашенных препаратах.

**Цель работы – исследование дрожжевых клеток *Saccharomyces* в живом (неокрашенном) состоянии с использованием темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.**

С использованием темнопольной микроскопии изучают препараты типа «*раздавленная капля*». Для этого исследуемый материал (культуру микроорганизма в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным. При этом предметные стекла должны быть не толще 1,1-1,2 мм, а покровные 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц (эти дефекты будут видны ярко святящимися и не позволят наблюдать препарат).

Процедура настройки освещения для темнопольной микроскопии:

- 1) заменяют светлопольный конденсор темнопольным;
- 2) на верхнюю линзу конденсора наносят иммерсионное масло;
- 3) поднимают конденсор до соприкосновения с нижней поверхностью предметного стекла;
- 4) объектив малого увеличения фокусируют на препарат;
- 5) с помощью центрировочных винтов переводят в центр поля зрения светлое пятно (иногда имеющее затемненный центральный участок);
- 6) поднимая и опуская конденсор, добиваются исчезновения затемненного центрального участка и получения равномерно освещенного светлого пятна. Если этого сделать не удастся, то надо проверить толщину предметного стекла (обычно такое явление наблюдается при использовании слишком толстых предметных стекол - конус света фокусируется в толще стекла);
- 7) после настройки света устанавливают объектив нужного увеличения и исследуют препарат.

Процедура настройки фазового контраста:

- 1) заменяют объективы и конденсор микроскопа на фазовые (обозначенные буквами Ph);
- 2) фазовый конденсор поворотом револьверного диска устанавливают на «0»;
- 3) устанавливают обычным образом изготовленный исследуемый препарат на предметный столик микроскопа;
- 4) выбирают фазовый объектив соответствующего увеличения и фокусируют его на препарат;
- 5) поворачивают диск конденсора и устанавливают соответствующую объективу кольцевую диафрагму;
- 6) вынимают из тубуса окуляр и вставляют на его место вспомогательный телескоп. Настраивают его так, чтобы были резко видны фазовая пластинка (в виде темного кольца) и кольцевая диафрагма (в виде

светлого кольца того же диаметра). С помощью регулировочных винтов на конденсоре совмещают эти кольца.

7) вынимают вспомогательный телескоп и вновь устанавливают окуляр.

Результаты микрофотографирования зарисуйте в таблице 4, обозначив дрожжевые клетки и окружающий их фон.

Таблица 4

| Результаты микрофотографирования дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (темнопольная микрофотография) | Результаты микрофотографирования дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (фазово-контрастная микрофотография) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                       |                                                                                                             |

#### 1.4 Люминесцентная (флюоресцентная) микрофотография

Основы люминесцентной микрофотографии были заложены **А.Келером**, обосновавшим принципиальную возможность подобного метода исследования. Первое устройство для его осуществления впервые было создано в 1911 г., однако широкое распространение получило двумя десятилетиями позже, когда для окрашивания препаратов были предложены специальные вещества – **флюорохромы**, избирательно связывающиеся с определенными структурами клеток (**М.Хайтингер**, 1933-1935). Чуть позже было предложено конъюгировать флюорохромы с антителами, что положило начало метода **иммунофлюоресценции** (**А.Н.Кунс**, 1942). В бывшем СССР наибольший вклад в развитие метода люминесцентной микрофотографии и создание отечественной промышленностью люминесцентных микроскопов и устройств, основанных на этом принципе, внес **М.Н.Мейсель** (1953).

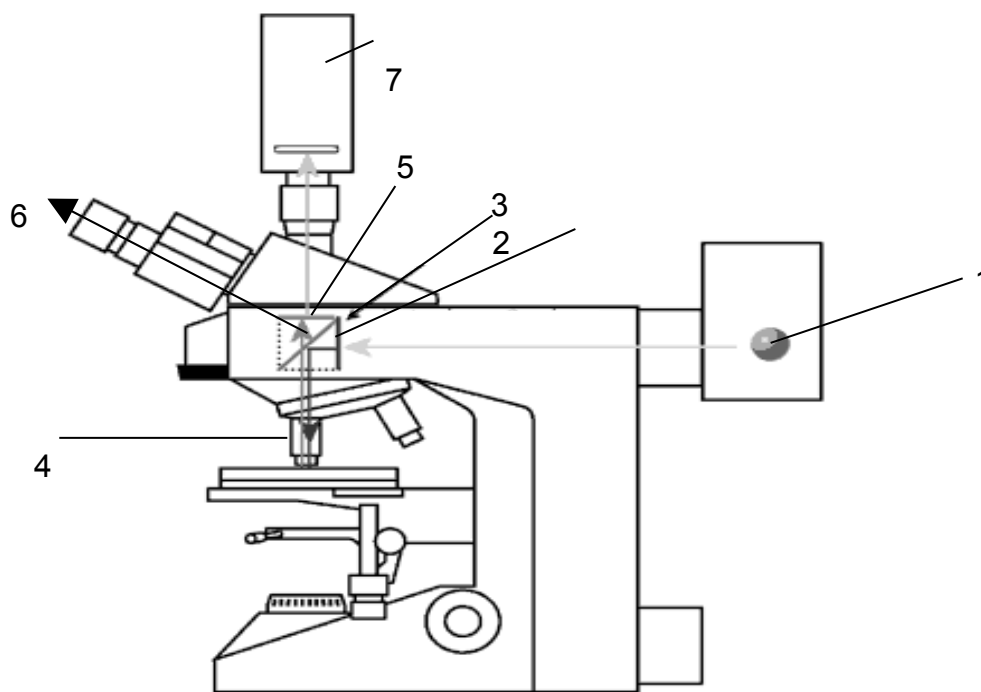
В основе люминесцентной микрофотографии (от лат. *lumen* - свет; греч. *micros* - малый + *skopeo* - рассматривать) лежит принцип люминесценции (видимого глазом свечения) микроорганизмов, клеток, тканей или отдельных структур. При этом физические основы возникновения свечения связаны с процессом поглощения определенными молекулами падающего на них света с последующим испусканием квантов с другой (большей) длиной волны (**правило Стокса**).

**Первичная** (собственная) **флюоресценция** возникает без специальной обработки препаратов и присуща ряду биологически активных веществ, таких, как ароматические аминокислоты, порфирины, хлорофилл, витамины А, В2, В1, некоторые антибиотики (тетрациклин) и химиотерапевтические вещества (акрихин, риванол). **Вторичная** (наведенная) **флюоресценция** возникает в результате обработки микрофотографируемых объектов флюоресцирующими красителями – флюорохромами. Некоторые из этих красителей диффузно распределяются в клетках, другие избирательно связываются с определёнными структурами

ми клеток или даже с определёнными химическими веществами.

Для проведения данного вида микроскопии используются специальные **люминесцентные (флюоресцентные) микроскопы** (рисунок 5), отличающиеся от обычного светового микроскопа наличием мощного **источника освещения** (ртутно-кварцевая лампа сверхвысокого давления или галогеновая кварцевая лампа накаливания), излучающего преимущественно в длинноволновой ультрафиолетовой или коротковолновой (сине-фиолетовой) области видимого спектра. Данный источник используется для возбуждения флюоресценции, перед чем испускаемый им свет проходит через специальный **возбуждающий** (сине-фиолетовый) **светофильтр** и отражается **интерференционной** светоделительной **пластинкой**, почти полностью отсекающими более длинноволновое излучение и пропускающими только ту часть спектра, которая возбуждает флюоресценцию. При этом в современных моделях люминесцентных микроскопов возбуждающее излучение попадает на препарат через объектив (!) После же возбуждения флюоресценции возникающий свет вновь попадает в объектив, после чего проходит через расположенный перед окуляром **запирающий** (желтый) **светофильтр**, отсекающий коротковолновое возбуждающее излучение и пропускающий свет люминесценции от препарата к глазу наблюдателя.

В силу использования подобной системы светофильтров интенсивность свечения наблюдаемого объекта обычно невелика, в связи с чем люминесцентную микроскопию следует проводить в специальных **затемнённых помещениях**.



1 – источник освещения; 2 – возбуждающий светофильтр; 3 - интерференционная пластинка; 4 – объектив; 5 – запирающий светофильтр; 6 – окуляр; 7 – регистрирующее устройство (фото- или видеокамера).

Рисунок 5 – Принципиальное устройство люминесцирующего микроскопа



Важным требованием при выполнении данного вида микроскопии является также применение **нефлюоресцирующих иммерсионных и заключающих сред**. В частности, для гашения собственной флюоресценции кедрового или иного иммерсионного масла к нему добавляют небольшие количества нитробензола (от 2 до 10 капель на 1 г). В свою очередь в качестве заключающих сред для препаратов могут быть использованы буферный раствор глицерина, а также нефлюоресцирующие полимеры (полистирол, поливиниловый спирт). В остальном при проведении люминесцентной микроскопии применяют обычные предметные и покровные стёкла, пропускающие излучение в используемой части спектра и не обладающие собственной люминесценцией.

Соответственно, важными преимуществами люминесцентной микроскопии являются: 1) цветное изображение; 2) высокая степень контрастности самосветящихся объектов на черном фоне; 3) возможность исследования клеточных структур, избирательно поглощающих различные флуорохромы, являющиеся при этом специфическими цитохимическими индикаторами; 4) возможность определения функционально-морфологических изменений клеток в динамике их развития; 5) возможность специфического окрашивания микроорганизмов (с использованием иммунофлюоресценции).

### **Цель работы – окрашивание дрожжевых клеток *Saccharomyces* акридиновым оранжевым по Дарту-Тернеру.**

Методика проведения работы.

Использование акридинового оранжевого в качестве флуорохрома основано на его уникальной способности, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, интеркалировать в них (размещаться параллельно парам оснований). При этом цвет свечения при последующем проведении люминесцентной микроскопии позволяет судить о структуре выявляемой с его использованием нуклеиновой кислоты. Так, максимум флюоресценции акридинового оранжевого в двуспиральной нативной ДНК располагается в зеленой области спектра (530 нм), тогда как в одноцепочечной ДНК и РНК он смещается в красную область (640 нм).

Для выполнения работы используйте взвесь пекарских дрожжей *Saccharomyces* в физиологическом растворе, из которой приготовьте мазок на предметном стекле.

Процедура окрашивания:

- 1) мазок фиксируют в смеси равных частей эфира и 95 % этилового спирта в течение 1 часа;
- 2) после этого мазок проводят через спирты нисходящей концентрации (80 %, 70 %, 50 %) и дистиллированную воду, окуная мазок по 5 раз в каждую порцию;
- 3) мазок окунают 4 раза в 1 % уксусную кислоту;
- 4) мазок переносят в дистиллированную воду на 2 мин;
- 5) мазок помещают в ацетатный буфер (рН 3,8) на 3 мин;
- 6) мазок переносят в 0,01 % раствор акридинового оранжевого на 3 мин;

- 7) промывают мазок в ацетатном буфере (pH 3,8) в течение 4 мин;
- 8) осторожно удаляют избыток буферного раствора фильтровальной бумагой и заключают мазок под покровное стекло;
- 9) приготовленный таким образом препарат исследуют с помощью флюоресцентного микроскопа (например «Биомед-2Л»).

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 5, обозначив дрожжевые клетки и окружающий их фон. Дайте объяснение присутствию в препарате дрожжевых клеток, окрашиваемых в красный и зеленый цвет.

Таблица 5

| Результаты микроскопии дрожжевых клеток <i>Saccharomyces</i> (люминесцентная микроскопия) | Обозначения |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                                                                           |             |

## 1.5 Электронная микроскопия

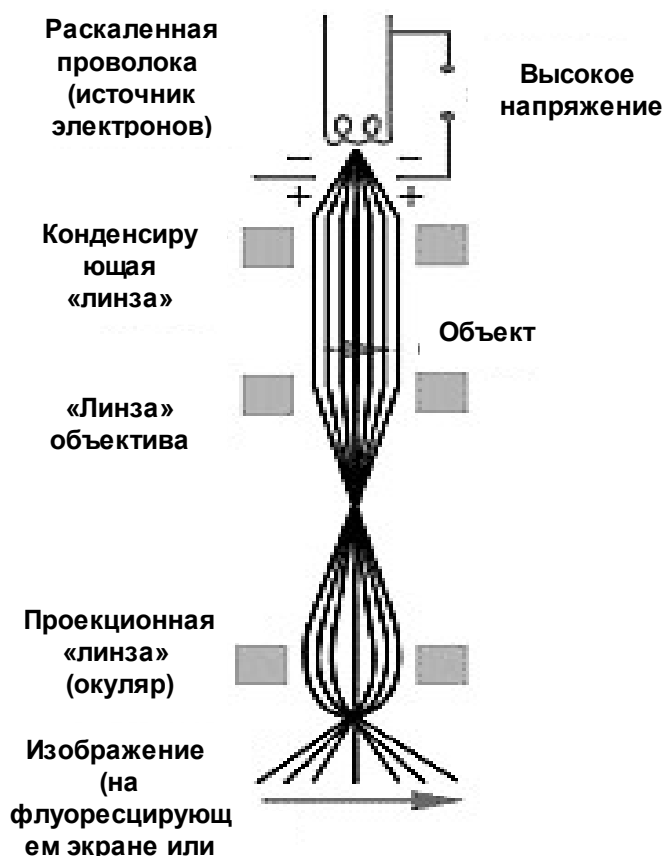
Теоретические основы использования электронов для наблюдения микроскопических объектов были заложены **У.Гамильтоном**, установившим аналогию между прохождением световых лучей в оптически неоднородных средах и траекториями частиц в силовых полях, а также **де Бройлем**, выдвинувшим гипотезу о существовании у электрона одновременно корпускулярных и волновых свойств. При этом, благодаря чрезвычайно малой длине волны электронов, которая уменьшается в прямой зависимости от подаваемого ускоряющего напряжения (см. ниже) теоретически рассчитанный **предел разрешения**, характеризующий способность прибора отобразить отдельно мелкие, максимально близко расположенные детали объекта, у электронного микроскопа составляет 2-3 Å (**Ангстрем**, где  $1\text{Å}=10^{-10}\text{м}$ ), что в несколько тысяч раз выше, чем у оптического микроскопа. Первое изображение объекта, сформированное пучками электронов, было получено в 1931г. немецкими учеными **М. Кноллем** и **Э.Руска**.

В конструкциях современных электронных микроскопов источником электронов служит металл (обычно вольфрам), из которого после его нагревания до 2500 °С в результате **термоэлектронной эмиссии** испускаются электроны. С помощью электрических и магнитных полей формирующийся **поток электронов** можно ускорять и замедлять, а также отклонять в любых направлениях и фокусировать. Таким образом, роль линз в электронном микроскопе играет совокупность соответствующим образом рассчитанных магнитных, электростатических и комбинированных устройств, называемых **«электронными линзами»**. Необходимым условием перемещения электронов в виде пучка на большое расстояние является также создание на их пути **вакуума**, поскольку в

этом случае средняя длина свободного пробега электронов между столкновениями с газовыми молекулами будет значительно превышать расстояние, на которое они должны перемещаться. Для этих целей достаточно поддерживать в рабочей камере отрицательное давление приблизительно  $10^{-4}$  Па.

По характеру исследования объектов электронные микроскопы разделяют на **просвечивающие, отражательные, эмиссионные, растровые, теневые** и **зеркальные**, среди которых первые два являются наиболее часто используемыми.

Оптическая схема **просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа** (рисунок 6) полностью эквивалентна соответствующей схеме оптического микроскопа, в котором световой луч заменяется электронным лучом, а системы стеклянных линз заменяются системами электронных линз. Соответственно, просвечивающий электронный микроскоп состоит из следующих основных узлов: **осветительной системы, камеры объекта, фокусирующей системы и блока регистрации конечного изображения**, состоящего из фотокамеры и флуоресцирующего экрана. Все эти узлы соединены друг с другом, образуя так называемую «колонну микроскопа», внутри которой поддерживается вакуум. Другим важным требованием, предъявляемым к исследуемому объекту, является его толщина менее чем 0,1 мкм. Окончательное же изображение объекта формируется после соответствующей фокусировки прошедшего сквозь него пучка электронов на **фотопленке** или **флуоресцирующем экране**, покрытом специальным веществом – люминофором (аналогичен экрану в кинескопах телевизоров) и превращающем электронное изображение в видимое.



## Рисунок 6 – Принципиальная схема просвечивающего электронного микроскопа

При этом образование изображения в просвечивающем электронном микроскопе связано главным образом с различной степенью рассеяния электронов различными участками исследуемого образца и в меньшей мере с различием в поглощении электронов этими участками. Контраст усиливают также, применяя «**электронные красители**» (четырёхокись осмия, уранил и др.), избирательно связывающиеся с некоторыми участками объекта. Устроенные подобным образом современные просвечивающие электронные микроскопы обеспечивают **максимальное полезное увеличение** до 400000 раз, что соответствует **разрешающей способности** в 5,0 Å. Выявляемое с использованием просвечивающей электронной микроскопии тонкое строение бактериальных клеток называют **ультраструктурой**.

В **отражательном (сканирующем) электронном микроскопе** изображение создается с помощью электронов, отраженных (рассеянных) поверхностным слоем объекта при его облучении под малым углом (приблизительно несколько градусов) к поверхности. Соответственно, образование изображения обусловлено различием рассеяния электронов в разных точках объекта в зависимости от его поверхностного микрорельефа, а сам результат подобной микроскопии предстает в виде структуры поверхности наблюдаемого объекта. Контрастность может быть усилена напылением на поверхность объекта частиц металла. Достигнутая разрешающая способность микроскопов такого типа составляет порядка 100 Å.

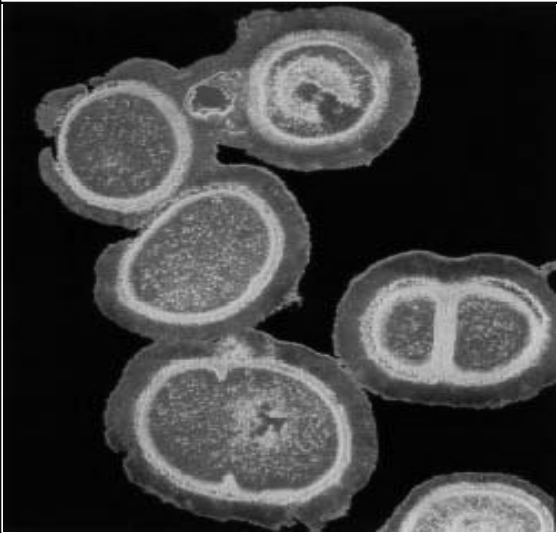
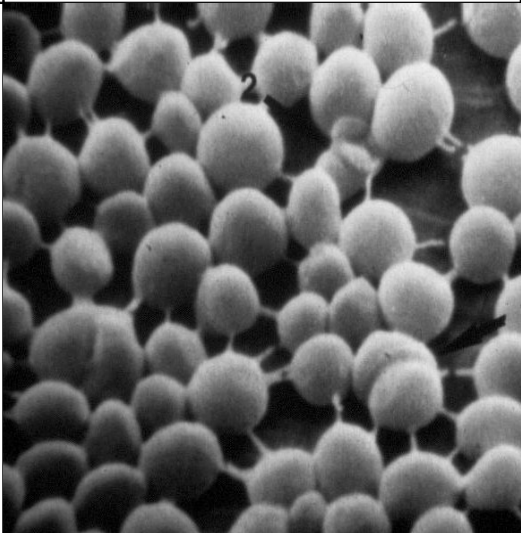
**Цель работы - сравнительное использование просвечивающей и отражательной электронной микроскопии на примере исследования клеток *Staphylococcus spp.***

Методика выполнения работы.

Рассмотрите и зарисуйте результаты просвечивающей (а) и отражательной (б) электронной микроскопии (ЭМ) клеток *Staphylococcus spp.* в таблице 6. На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале внесите в таблицу данные об основных характеристиках использованных методах микроскопии.

Таблица 6

| Сравниваемые характеристики                | Просвечивающая ЭМ | Отражательная ЭМ |
|--------------------------------------------|-------------------|------------------|
| 1                                          | 2                 | 3                |
| Траектория электронов относительно объекта |                   |                  |

|                             |                                                                                   |                                                                                    |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Используемые красители      |                                                                                   |                                                                                    |
| Разрешающая способность     |                                                                                   |                                                                                    |
| 1                           | 2                                                                                 | 3                                                                                  |
| Максимальное увеличение     |                                                                                   |                                                                                    |
| Результат микроскопии       |  |  |
| Выявляемые свойства объекта |                                                                                   |                                                                                    |

## 1.6 Сканирующая зондовая микроскопия

Теоретические основы использования так называемого «туннельного эффекта» для определения рельефа поверхности на микроуровне были заложены **Р.Янгом** в 1966 году. Развивая эти идеи **Г.Рорер** и **Г.Бинниг** в 1979 создали сканирующий туннельный микроскоп, на котором впервые была достигнута возможность визуализации отдельно взятого атома (Нобелевская премия по физике, 1986 г.).

В настоящее время все подобные методы объединяются понятием «**сканирующая зондовая микроскопия**» (СЗМ), в основе которой лежит взаимодействие между твердотельной остроконечной иглой - **нанозондом**, приближенным к объекту исследования на некоторое малое расстояние и перемещаемым над ним с использованием прецизионных механических систем (рисунок 7). При этом формирование изображения при сканирующей зондовой микроскопии определяется характерными параметрами наноконтакта между зондом и образцом, которые превращаются в изображение после обработки поступающего сигнала на ПК с соответствующим программным обеспечением.

При этом в зависимости от природы взаимодействия между нанозондом и объектом основными вариантами СЗМ являются:

– сканирующая туннельная микроскопия (СТМ) при которой между нанозондом и объектом поддерживается небольшая разница потенциалов в десятки доли вольты, а детектируемым параметром является проходящий между ними **туннельный ток**, сила которого зависит от высоты кончика иглы над образцом (метод применим только для проводящих образцов, рисунок 7а));

– сканирующая силовая или атомно-силовая микроскопия (АСМ), разработанная **Г.Биннигом, Х.Гербером** и **С.Квайтом** в 1986 году, с использованием которой можно исследовать любые образцы (не только проводящие). В основе данного метода лежит сверхострая игла - **кантилевер**, закрепленная на микробалке и скользящая над исследуемой поверхностью. Соответственно, детектируемым параметром является локальные силы, действующие между нанозондом и объектом, причиной возникновения которых могут быть Ван-дер-Ваальсовское, электростатическое, магнитное взаимодействия, трение и т.п. Сила притяжения или отталкивания, выражающаяся в изменении угла наклона микробалки, регистрируется при помощи датчика, чаще всего оптического (лазер – фотодиод, рисунок 7б).

Таким образом, в отличие от световой и электронной микроскопии, при которых объект облучается потоком квантов света или электронов, при проведении сканирующей зондовой микроскопии объект скорее «ощупывается».

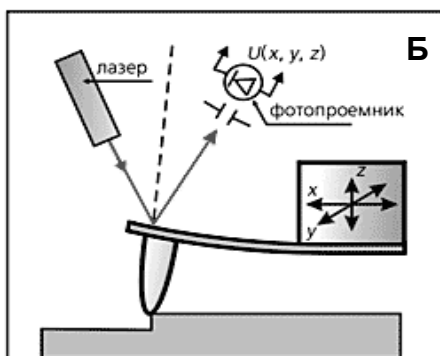
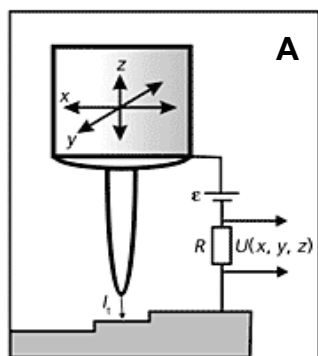
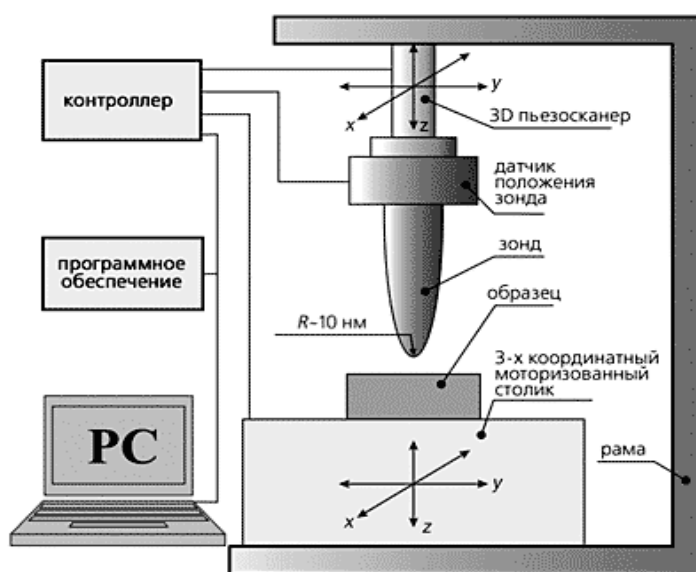


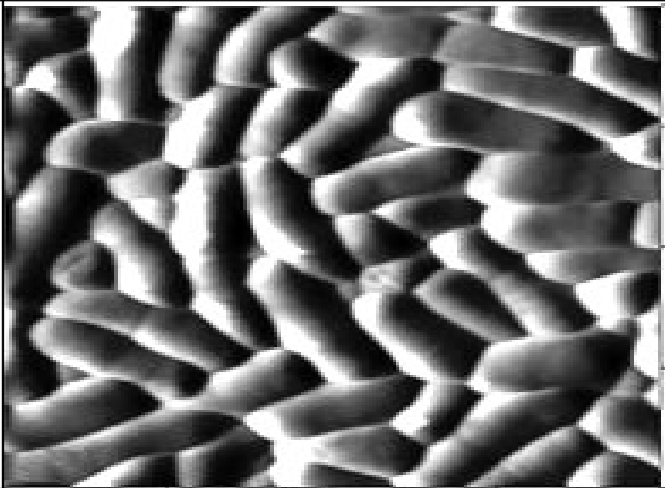
Рисунок 7 – Устройство сканирующего зондового микроскопа (сверху) и принципы выявления структуры поверхности при туннельной (а) и атомно-силовой микроскопии (б)

**Цель работы - изучить принцип действия атомно-силового микроскопа на примере исследования клеток *Escherichia coli*.**

Методика выполнения работы:

Рассмотрите и зарисуйте результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ) клеток *Escherichia coli* в таблице 7. На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале внесите в таблицу данные об основных характеристиках использованного метода микроскопии.

Таблица 7

| Характеристики метода         | Атомно-силовая микроскопия                                                           |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Основные узлы микроскопа      |                                                                                      |
| Принцип получения изображения |                                                                                      |
| Разрешающая способность       |                                                                                      |
| Максимальное увеличение       |                                                                                      |
| Результат микроскопии         |  |
| Выявляемые свойства объекта   |                                                                                      |

## 2 Строение бактериальных клеток

### 2.1 Сравнительный анализ прокариотических и эукариотических клеток

Различия в строении *прокариотических* и *эукариотических* клеток представляют собой наиболее значимую границу в разнообразии живого мира. При этом по уровню сложности своей организации эти два принципиально различно устроенных типа клеток, отличающиеся друг от друга на несколько порядков.

**Цель работы – получить сравнительные представления о прокариотических и эукариотических клетках**

Методика выполнения работы.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 8, содержащую данные об основных признаках, дифференцирующих про- и эукариотические клетки.

Таблица 8

| Признаки                                                                                                              | Прокариоты | Эукариоты |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| 1                                                                                                                     | 2          | 3         |
| Число хромосом                                                                                                        |            |           |
| Хромосомы кольцевые                                                                                                   |            |           |
| Хромосомы линейные                                                                                                    |            |           |
| Константа седиментации рибосом                                                                                        |            |           |
| Константы седиментации рибосомных РНК                                                                                 |            |           |
| Локализация рибосом:<br>- рассеяны в цитоплазме<br>- прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму                     |            |           |
| Аппарат Гольджи                                                                                                       |            |           |
| Лизосомы                                                                                                              |            |           |
| Вакуоли, окруженные мембранами                                                                                        |            |           |
| Газовые вакуоли, не окруженные мембранами                                                                             |            |           |
| Пероксисомы                                                                                                           |            |           |
| Митохондрии                                                                                                           |            |           |
| Хлоропласты (у фототрофов)                                                                                            |            |           |
| Система микротрубочек                                                                                                 |            |           |
| Жгутики (если присутствуют:<br>- диаметр<br>- в поперечном сечении имеют характерное расположение микротрубочек «9+2» |            |           |



|                                                                                                          |   |   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| Эндоспоры                                                                                                |   |   |
| В составе мембран присутствуют:<br>- разветвленные и циклопропановые жирные кис                          |   |   |
| 1                                                                                                        | 2 | 3 |
| лоты                                                                                                     |   |   |
| - полиненасыщенные жирные кислоты и стеролы                                                              |   |   |
| В составе клеточных стенок присутствуют:<br>- пептидогликан<br>- тейхоевые кислоты<br>- липополисахариды |   |   |
| Размножение клеток происходит путем:<br>- простого деления<br>- митоза                                   |   |   |
| Мейоз                                                                                                    |   |   |

**Цель работы – изучить размеры и общую морфологию прокариотических и эукариотических клеток в мазке буккального эпителия (световая микроскопия, простой метод окрашивания)**

Одним из важных признаков, отражающих различия в сложности организации прокариотических и эукариотических клеток являются их линейные размеры. В среднем размеры прокариотических клеток находятся в пределах 0,5-3,0 мкм. Например, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 50 мкм, а клетки *Achromatium oxaliferum* достигают в длину 15-100 мкм при поперечном размере 5-33 мкм. С другой стороны, самые мелкие прокариоты – микоплазмы (например, *Mycoplasma mycoides*) могут иметь размеры всего 0,1×0,25 мкм. На этом фоне значительно более сложно организованные эукариотические клетки характеризуются линейными размерами как минимум на порядок выше: например, дрожжевые клетки *Saccharomyces* имеют в диаметре 6-10 мкм, а зеленая водоросль *Chlorella* 2-10 мкм. Обычные же размеры эукариотических клеток обычно 100 мкм и выше.

Методика выполнения работы:

- 1) стеклянной лопаточкой возьмите соскоб с внутренней поверхности щеки и внесите его круговыми движениями в каплю воды, предварительно нанесенную в центр предметного стекла;
- 2) после высыхания мазка зафиксируйте его над пламенем горелки;
- 3) на поверхность мазка нанесите краситель – щелочной раствор метиленового синего Леффлера (см. выше) на 3-5 мин;
- 4) мазок промойте водой, высушите на воздухе и микроскопируйте;
- 5) результаты микроскопии зарисуйте в таблице 9, обозначив прокариотические клетки (бактерии) и их примерные размеры, а также эукариотические клетки (клетки буккального эпителия), обозначив их ядра и примерные линейные размеры.

Таблица 9

|                                                    |              |
|----------------------------------------------------|--------------|
| Результаты микроскопии (простой метод окрашивания) | Обозначения: |
|                                                    |              |

## 2.2 Окраска по Граму и ее использование для дифференциации бактерий с различным строением клеточной стенки

Данный сложный (использующий более одного действующего вещества) метод окраски впервые был предложен в 1884г. датским ученым Х.Грамом (Ch.-Gram) для окрашивания тканей, а позднее получил широкое распространение при окраске прокариот и был назван именем его разработчика.

Важное значение **метода окраски по Граму** в микробиологии определяется тем, что результаты окрашивания бактерий оказываются напрямую связанными с особенностями строения их клеточных стенок. Объяснением этого являются выраженные различия в строении клеточных стенок **грамположительных** (по данному методу окрашивающихся в фиолетовый цвет) и **грамотрицательных** (по данному методу окрашивающихся в красный цвет) бактерий. Первые из них имеют достаточно толстые слои из муреина (у зубактерий) или псевдомуреина (у архебактерий), удерживающие образующийся в протопласте комплекс «кристаллический фиолетовый + иод» и препятствующие его вымыванию из клетки при последующей обработке спиртом. В свою очередь грамотрицательные бактерии не образуют подобных гетерополисахаридов или содержат их в небольших количествах, недостаточных для предотвращения экстрагирования комплекса красителя с йодом из протопласта при его обработке спиртом. Сказанное объясняет, почему несмотря на кажущуюся простоту метода Грама, именно он получил наибольшее распространение в качестве важного таксономически значимого теста, с результатами которого хорошо коррелируют многие прочие свойства прокариот.

Для реализации данного метода готовят специальный краситель – **карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллического фиолетового**: 1 г красителя растирают в ступке с 2 г кристаллической карболовой кислоты до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями 10 мл 96% спирта, окончательно разводят 100 мл дистиллированной воды, сливают в бутыл, отстаивают и через сутки фильтруют. Вторым важным компонентом для окраски по Граму является **раствор Люголя**: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 2 г иодида калия и 1 г иода кристаллического, смесь хорошо укупоривают и оставляют на сутки, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды.

Процедура окрашивания по Граму начинается с обработки фиксированных бактериальных клеток красителем кристаллическим фиолетовым, за чем следует обработка клеток раствором иода. Эти два компонента вместе образуют крупномолекулярный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в спирте. Поэтому, используя спирт, клетки дифференцируют: при промывании в нем «грамположительные» клетки удерживают комплекс «кристаллический фиолетовый + иод» и остаются синими, а «грамотрицательные» обесцвечиваются.

Для того же, чтобы также сделать их видимыми, образцы дополнительно окрашивают каким-либо контрастным красным красителем – обычно фуксином.

**Цель работы – освоить сложный метод окрашивания бактерий по Граму (в модификации А.И.Синева).**

Среди множества предложенных в настоящее время вариантов, окрашивания по Граму (по Г.П.Калине, по Эткинсу и др.) достаточно широкое распространение получила *модификация по А.И.Синеву*, для реализации которой предварительно готовят полоски фильтровальной бумаги, пропитанной раствором кристаллического фиолетового и высушенной.

Процедура окрашивания:

- 1) на предметном стекле готовят мазок бактериальной культуры, который фиксируют над пламенем горелки;
- 2) на мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, пропитанной раствором кристаллического фиолетового, на который наносят 2-3 капли воды и выдерживают в течение 2 мин;
- 3) снимают фильтровальную бумагу;
- 4) не смывая водой (!) на препарат наносят 2-3 капли раствора Люголя и выдерживают в течение 1 мин;
- 5) сливают раствор Люголя;
- 6) опускают предметное стекло в стаканчик с 95 % спиртом, где тщательно прополаскивают препарат в течение 0,5-1 мин, пока не перестанет отходить краситель;
- 7) тщательно промывают препарат водой;
- 8) наносят на предметное стекло раствор водного фуксина и прокрашивают препарат в течение 0,5-1 минут;
- 9) краситель сливают, тщательно промывают препарат водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Для выполнения работы приготовьте по 3 образца смеси из двух исследуемых бактериальных культур (палочек и кокков), первый из которых доведите до этапа 3 включительно и промойте водой, второй в соответствии со всей описанной процедурой за исключением этапов №4-5, третий до этапа №7 включительно, а четвертый окрасьте в соответствии со всей описанной выше процедурой. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 10.

Таблица 10

| Результаты микроскопии смеси микроорганизмов после окрашивания кристаллическим фиолетовым (этап №3) | Результаты микроскопии смеси микроорганизмов при окрашивании без раствора Люголя (этапы 4-5) | Результаты микроскопии смеси микроорганизмов после обесцвечивания спиртом (этап №7) | Результаты микроскопии смеси микроорганизмов по методу Грама |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                                                                                     |                                                                                              |                                                                                     |                                                              |

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|--|--|--|--|

На основании полученных результатов дайте характеристику основных компонентов, используемых в методе окраски по Граму (таблица 11).

Таблица 11

| Наименование компонентов                                                                                           | Функциональное назначение* | Результат воздействия |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1 Кристаллический фиолетовый                                                                                       |                            |                       |
| 2 Раствор Люголя                                                                                                   |                            |                       |
| 3 95 % спирт                                                                                                       |                            |                       |
| 4 Водный фуксин                                                                                                    |                            |                       |
| * варианты: основной краситель, дополнительный краситель, фиксатор основного красителя, дифференцирующий компонент |                            |                       |

**Цель работы – изучить ультраструктуру клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (по результатам просвечивающей электронной микроскопии).**

Тонкое строение поверхностных барьерных структур грамположительных и грамотрицательных бактерий может быть выявлено с использованием просвечивающей электронной микроскопии. При этом на электроннограммах у различных форм могут определяться: 1) *цитоплазматическая мембрана*; 2) *пептидогликан* (однослойный или многослойный; 3) *наружная мембрана*; 4) *периплазматическое пространство*.

Методика выполнения работы.

Зарисуйте строение поверхностных барьерных структур у бактерий, представленных на рисунке 16, дайте определение цифровым обозначениям, обоснуйте их отнесение к грамположительным или грамотрицательным формам. На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 12.

Таблица 12

| Признаки                                                                     | Грам(+) | Грам(-) |
|------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
| Процентное содержание пептидогликана в высушенном препарате клеточных стенок |         |         |
| Присутствие тейхоевых или липотейхоевых кислот                               |         |         |
| Наличие наружной мембраны (в клеточной стенке) в дополнение к ЦПМ            |         |         |
| Процентное содержание липидов в высушенном препарате клеточных стенок        |         |         |
| Присутствие липополисахаридов в наружной мембране клеточной стенки           |         |         |

|                                          |  |  |
|------------------------------------------|--|--|
| Присутствие 2-кето-3-дезоксиктоктоната   |  |  |
| Наличие периплазматического пространства |  |  |

## 2.3 Капсулы бактерий и методы их выделения

**Капсула** - обволакивающее бактериальное клетку образование, имеющее аморфное строение, но достаточно прочно связанное с нижележащими слоями клеточной стенки.

В большинстве случаев капсула состоит из полисахаридов гомо- или гетерополимерной природы, которые помимо глюкозы содержат аминсахара, рамнозу, уроновую кислоту или иные органические кислоты. Исключение составляет капсула некоторых видов *Bacillus*, построенная из полипептида, являющегося полимером D-глутаминовой кислоты. При этом биосинтез капсул независим от компонентного состава среды культивирования или используемого субстрата и принципиально сходен с механизмами построения пептидогликана клеточной стенки соответствующих бактерий.

Если толщина капсулы больше 0,2 мкм, то она может быть обнаружена с использованием световой микроскопии. Если же толщина подобного образования меньше 0,2 мкм, оно может быть обнаружено только с помощью электронного микроскопа и в этом случае описывается как «**микрoкапсула**».

**Цель работы – освоить методы выявления капсул с использованием световой микроскопии.**

В мазках из органов и тканей капсулы можно обнаружить при помощи простых методов окрашивания. При этом тела бактериальных клеток и окружающие тканевые элементы будут интенсивно воспринимать краситель, в то время как капсулы не будут окрашиваться и за счет этого восприниматься как ободки «просветления» вокруг бактериальных клеток.

При проведении микроскопического исследования чистых культур выявление капсул возможно с использованием специальных методов окраски (по Ольту, по Антонии, по Гису). Среди них наибольшее распространение получил метод окраски **по Бурри-Гинсу**, сочетающий принципы позитивного и негативного окрашивания.

Методика выполнения работы:

- 1) на поверхность предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры в физиологическом растворе (не высушивают! не фиксируют!);
- 2) сразу после этого наносят ту же каплю туши и смешивают ее петлей с каплей исследуемой культуры;
- 3) ребром покровного стекла распределяют смесь по поверхности предметного стекла;
- 4) мазок высушивают на воздухе и после высыхания мазок фиксируют над пламенем горелки;
- 5) промывают мазок водой;

- 6) наносят на мазок карболовый раствор фуксина на 5-10 мин;
- 7) сливают краситель, мазок тщательно промывают водой и высушивают.

Для выполнения работы используйте чистую культуру *Klebsiella spp.*, а также предоставляемый мазок-отпечаток (постоянный препарат) из органов лабораторного животного, инфицированного данным микроорганизмом. Приготовьте мазок исследуемой бактериальной культуры, который окрасьте в соответствии с описанной выше процедурой.

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 13, обозначив тела бактериальных клеток, капсулы и окружающий их фон.

Сравните толщину капсул, выявляемых у исследуемого микроорганизма *in vitro* и *in vivo*; опишите биологическое значение данной структуры.

Таблица 13

| Результаты микроскопии <i>Klebsiella spp.</i> , окрашенных по методу Бурри-Гинса | Результаты микроскопии <i>Klebsiella spp.</i> в мазках-отпечатках их органов лабораторного животного (простой метод окраски) |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                  |                                                                                                                              |

**Цель работы – изучить ультраструктуру капсулы (по результатам просвечивающей электронной микроскопии)**

При просвечивающей электронной микроскопии капсула выглядит как плотно примыкающий к наружной поверхности клеточной стенки волокнистый слой, имеющий по сравнению с ней более разряженную плотность и менее упорядоченную структуру.

Методика выполнения работы.

Рассмотрите и зарисуйте электроннограмму *Streptococcus zooepidemicus* (рисунок 8), капсула которой состоит из гиалуроновой кислоты (линейного полимера глюкокуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина); обозначьте цитоплазму, нуклеоид, цитоплазматическую мембрану, клеточную стенку и капсульное вещество.

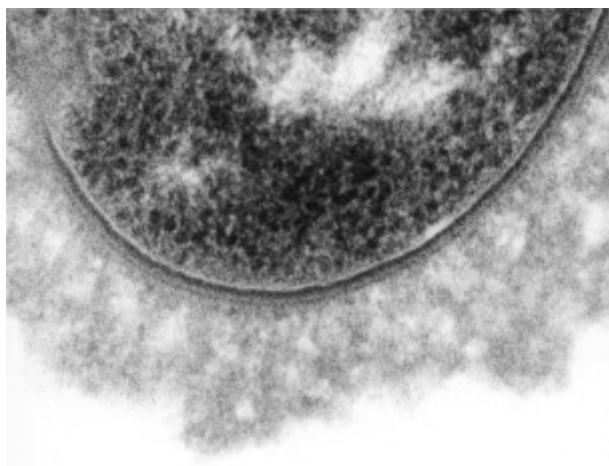


Рисунок 8 – Капсула *Streptococcus zooepidemicus* (просвечивающая электронная микроскопия).

## 2.4 Жгутики бактерий и методы их выявления

Жгутики – морфологические образования, определяющие способность бактериальных клеток к движению в жидкой среде.

В структуре жгутика выделяют три основные части: 1) **фибриллу** - полый белковый цилиндр длиной от 3 до 15 мкм и толщиной 10-20 нм, состоящий из белка флагеллина; 2) расположенный у основания фибриллы **крюк**, состоящий из т.н. «белка крюка»; 3) **базальное тельце** - крупное мультибелковое образование, фиксированное в клеточной стенке и являющееся своеобразным «мотором» для вращения жгутика. В свою очередь базальное тельце состоит из 9—12 различных белков и включает три основные детали: 1) **стержень**, стыкующийся с крюком; 2) нанизанные на стержень соосные **диски (M и S)**, из которых самый внутренний (M) встроен в цитоплазматическую мембрану, а S-диск располагается в периплазматическом пространстве грамотрицательных или в пептидогликановом окружении грамположительных бактерий; 3) **цитоплазматический фрагмент**, утопленный в цитозоле. Кроме того грамотрицательные бактерии, имеющие кроме внутренней еще и наружную мембрану, располагают двумя дополнительными **дисками (P и L)**, из которых первый локализован в пептидогликановом слое, а второй – в наружной мембране.

Источником движения (вращения) жгутиков является трансмембранный электрохимический потенциал  $\Delta\mu\text{H}^+$ , определяющий ток протонов  $\text{H}^+$  из внешней среды в цитоплазму клетки и за счет этого запускающий процесс вращения диска M относительно встроенных в цитоплазматическую мембрану вспомогательных белковых комплексов.

**Цель работы – освоить методы выявления жгутиков с использованием световой микроскопии**

Окрашивание жгутиков является одной из самых трудных процедур в микробиологической технике, так как данные структуры очень легко повреждаются при малейших механических или химических воздействиях. Указанные особенности определяют следующие требования по подготовке предметных и по-



кровных стекол, которые должны быть абсолютно чистыми и обезжиренными:

- новые покровные стекла кипятят в течение 10 мин в хромовой смеси (к 20 г соли  $K_2Cr_2O_7$  приливают 200 мл дистиллированной воды, в полученную смесь вливают 20 мл серной кислоты);
- после этого стекла промывают в слабом растворе NaOH в течение 5 мин;
- после этого стекла промывают большим количеством дистиллированной воды;
- после этого стекла промывают спиртом и закладывают на хранение в 96 % спирт;
- перед употреблением стекла вынимают пинцетом, оставшийся на них спирт удаляют обжиганием;
- важно на всех этапах обработки не касаться стекол руками и ничем их не вытирать.

Сама процедура окрашивания предусматривает особую технику нанесения исследуемого материала на стекло, а также обработку мазка **протравливающими растворами**, которые усиливают последующее действие красителя. При этом среди методов окраски жгутиков по Бениньетти, Леффлеру, Грею и др., наиболее часто используемым является **серебрение по Морозову**. Используемый при его осуществлении краситель готовят следующим способом: 5 г соли  $AgNO_3$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды, к полученному раствору по каплям добавляют раствор аммиака до полного растворения осадка и формирования легкой опалесценции; непосредственно перед краской полученный краситель разводят дистиллированной водой 1:10.

Процедура окрашивания:

- 1) исследуемую культуру выращивают на плотной питательной среде в течение 12-18 часов (использование «старых» культур может негативно сказаться на качестве препарата);
- 2) осторожным прикосновением петли к культуре берут исследуемый материал, который вносят в пробирку с несколькими миллилитрами воды; петлю погружают в воду и держат ее неподвижно некоторое время (нельзя растирать культуру по стенке пробирки и не взбалтывать!); повторяют эту процедуру 2-3 раза, пока не получится слабая, лишь слегка опалесцирующая взвесь;
- 3) пробирку со взвесью помещают в термостат при 37 °C на 15 мин;
- 4) каплю взвеси осторожно переносят петлей на покровное стекло и высушивают на воздухе;
- 5) после высыхания препарат фиксируют над пламенем горелки;
- 6) на поверхность препарата наливают первый протравливающий раствор (1 мл ледяной уксусной кислоты + 2 мл формалина + 100 мл дистиллированной воды), выдерживают 1 мин и сливают;
- 7) тщательно промывают препарат водой;



- 8) на поверхность препарата наливают второй протравливающий раствор (5 г танина + 1 мл карболовой кислоты + 100 мл дистиллированной воды) и подогревают над пламенем горелки до отхождения паров;
- 9) тщательно промывают препарат водой;
- 10) на поверхность препарата наносят краситель (раствор нитрата серебра, см. выше), нагревают над пламенем горелки в течение 1-2 мин до появления темно-коричневой окраски;
- 11) тщательно промывают препарат водой и высушивают.

Для выполнения работы приготовьте мазок исследуемой бактериальной культуры *Proteus spp.*, который окрасьте в соответствии с описанной выше процедурой.

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 14

На основании количества и характера расположения жгутиков на поверхности бактериальной клетки отнесите ее к одному из следующих типов: **монотрихи** (имеют только один жгутик, прикрепленный к одному полюсу клетки), **лофотрихи** (на одном из своих полюсов имеют пучок из 2-50 жгутиков), **амфитрихи** (пучки жгутиков имеются на каждом из полюсов бактериальной клетки), **перитрихи** (многочисленные жгутики расположены по всей поверхности клетки).

Таблица 14

| Результаты микроскопии<br><i>Proteus spp.</i> ,<br>окрашенных по методу Морозова | Обозначения                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                                                  | 1 - тела бактериальных клеток<br>2 - жгутики |
|                                                                                  | Выявленный тип бактерий-жгутико-<br>ностцев: |

**Цель работы – изучить ультраструктуру базального тельца жгутика.**

Методика выполнения работы.

Зарисуйте представленную электроннограмму (рисунок 9), обозначьте на ней цитоплазматическую мембрану; стержень жгутика; диски M, S, P и L; белковые комплексы, окружающие диск M.

Укажите направление предполагаемого тока протонов  $H^+$ , являющегося источником вращения жгутика.

Обоснуйте принадлежность данного базального тельца грамположитель-

ным или граммотрицательным бактериям.

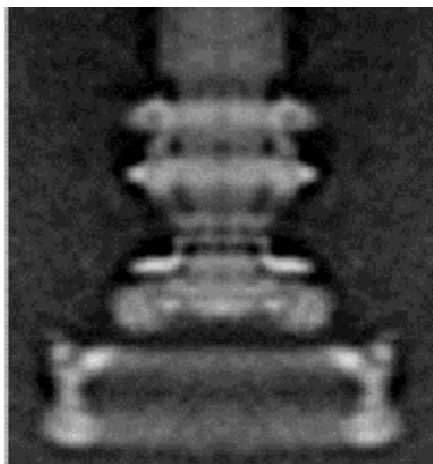


Рисунок 9 – Базальное тельце жгутика (реконструкция по результатам электронной микроскопии)

## 2.5 Нуклеоид бактериальной клетки

**Нуклеоид** - центрально расположенное в цитоплазме бактериальной клетки образование, не отделяемое от нее мембранной оболочкой и содержащее наследственный материал (**дезоксирибонуклеиновую кислоту - ДНК**), а также связанные с ним белки.

У большинства известных бактерий наследственная информация содержится в одной единственной кольцевой (замкнутой на себя) нити ДНК, называемой «**бактериальной хромосомой**». Другими более редкими вариантами является существование у бактерий линейных хромосом (у *Borrellia*), двух (у *Rhodobacter sphaeroides*, *Vibrio cholerae*, *Brucella melitensis*, *Dienococcus radiodurans* и др.), а также трех кольцевых хромосом (у *Paracoccus denitrificans*) и даже одной линейной и одной кольцевой хромосомы (у *Agrobacterium tumefaciens*). Кроме того, существуют бактериальные виды, для которых характерно состояние своеобразной «полиплоидии», т.е. наличия в одной клетке нескольких идентичных хромосом. В частности, у микроорганизма вида *Desulfovibrio gigas* в одной клетке присутствует 10-15 идентичных хромосом, а у *Azotobacter chroococcum* их количество достигает 20-25. При этом хромосомы могут быть по-разному размещены во внутреннем пространстве бактериальной клетки: у *Bacillus subtilis*, имеющей от 2 до 9 одинаковых хромосом каждая из них образует свой собственный нуклеоид, в то время как у содержащей около 40 хромосом *Azotobacter vinelandii* все они объединены в единую структуру. Таким образом, понятия «нуклеоид» и «бактериальная хромосома» не всегда совпадают: в зависимости от условий нуклеоид прокариотической клетки может состоять из одной или некоторого числа копий хромосомы.

**Цель работы – освоить методы выявления нуклеоида с использованием световой микроскопии.**

Выявление нуклеоида при световой микроскопии возможно только у бактериальных клеток, имеющих достаточно крупные размеры (не менее 10 мкм в длину).

Для специфического окрашивания этих структур используют **метод Романовского**, в основе которого лежит использование красителя **Гимзы** (состав: азур 1 – 3,772 г; эозин – 2,165 г, метиленовый синий – 1,563 г, метанол – 750,0 мл, глицерин – 256,0 мл). Важным требованием к проведению данного метода окрашивания являются нейтральные значения pH воды (pH=7,0), используемой для разведения красителя. Для этого она должна быть предварительно исследована с использованием одного из предназначенных для этих целей приборов – pH-метров (не с использованием бумажных индикаторов!), а в случае смещения pH в кислую сторону (pH<7,0) необходима коррекция данного параметра путем добавления 1 % раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Процедура окрашивания:

- 1) на предметном стекле готовят мазок бактериальной культуры, который фиксируют метиловым спиртом - 5 мин или **смесью Никифорова** (смеси равных частей 96° спирта и эфира) – 15 мин. При проведении окрашивания по **методу Пикарского** препарат фиксируют 1N раствором HCl при подогревании до 60 °C в течение 7 мин, после этого промывают водой;
- 2) на мазок наносят рабочий раствор красителя Гимзы (например, производства фирмы «Абрис+», г.Санкт-Петербург) предварительно растворенного в дистиллированной воде с pH=7,0 в соотношении 1:10-1:12;
- 3) препарат окрашивают в течение 10-20 мин;
- 4) тщательно промывают препарат водой, высушивают в вертикальном положении на воздухе и микроскопируют (нуклеоиды окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, а тела бактериальных клеток в слабо-розовый).

Для выполнения работы приготовьте мазок исследуемой бактериальной культуры *Bacillus spp.*, который окрасьте в соответствии с описанной выше процедурой. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 15

Таблица 15

| Результаты микроскопии<br><i>Bacillus spp.</i> ,<br>окрашенных по методу Романовского | Обозначения                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                                                                       | 1 - тела бактериальных клеток<br>2 - нуклеоиды |

**Цель работы – изучить «петельную» укладку бактериальной хромосомы (по результатам электронной микроскопии).**

При просвечивающей электронной микроскопии бактериальных клеток зона нуклеоида оказывается свободной от других структур и выглядит менее

плотной по сравнению с окружающей цитоплазмой. При этом основу нуклеоида составляет клубок из множества тонких нитей ДНК толщиной 2-7 нм, иногда контактирующих с выростами цитоплазматической мембраны.

Подобная картина не позволяет получить истинного представления о характере укладки ДНК в составе нуклеоида, для выявления которой используют специальные техники (например, осмотрический лизис бактериальной клетки с выходом структур нуклеоида в окружающую среду и их фиксации на поддерживающей подложке). Применение подобного подхода позволяет продемонстрировать **петельную** организацию бактериальной хромосомы: ее укладка включает 20-100 независимо суперспирализованных петель размером около 40000 нуклеотидных пар и длиной 10-15 мкм, отходящих от плотной центральной области.

Методика выполнения работы.

Зарисуйте представленную электроннограмму *Escherichia coli* после осмотического лизиса (рисунок 10), обозначьте тело бактериальной клетки, вышедшие наружу петли бактериальной хромосомы; сопоставьте их длину. Объясните, каким образом кольцевая хромосома с длиной контура 1-1,6 мм может быть помещена во внутренний объем бактериальной клетки длиной 1-6 мкм и шириной 0,3-1 мкм.

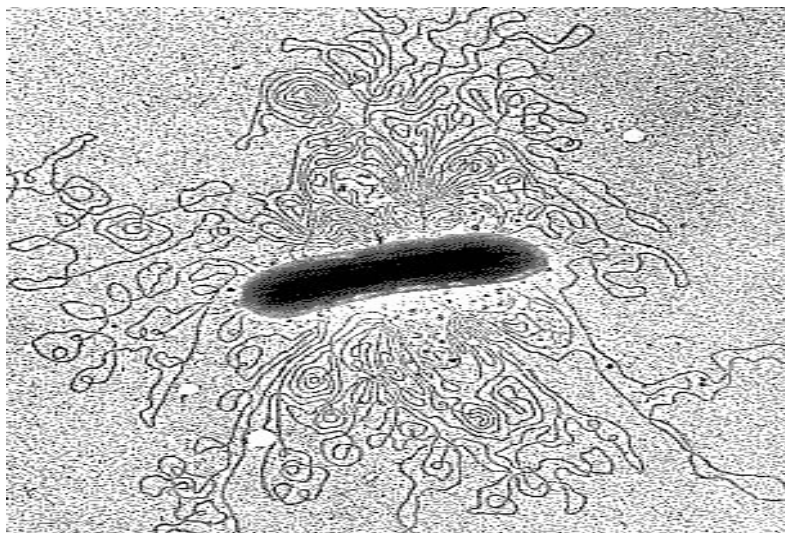


Рисунок 10 – Петельная укладка бактериальной хромосомы

## 2.6 Рибосомы

**Рибосомы** являются центральным звеном **белоксинтезирующего аппарата** бактериальной клетки, осуществляющим сопряжение двух других участников этого процесса – матричной (мРНК) и транспортных (тРНК) рибонуклеиновых кислот. В свою очередь в основе структуры рибосом лежит третий тип подобных молекул - рибосомальные РНК (рРНК), объединяющие вокруг себя вспомогательные белки и вместе с ними формирующие **большую** и **малую субъединицы** рибосомы. Взаимодействие же всех трех названных компонентов белоксинтезирующего аппарата бактериальной клетки как раз и является условием для процесса **трансляции** – перевода последовательностей нуклеотидов

(триплетов) мРНК в соответствующую ей последовательность аминокислот во вновь синтезируемой полипептидной цепи.

### Цель работы – изучить ультраструктуру рибосом.

Достаточно малые размеры рибосом определяют тот факт, что детали их строения не могут быть изучены не только при световой микроскопии, но и требуют очень высоких коэффициентов увеличения при использовании электронной микроскопии (на пределе ее разрешающих возможностей).

На полученных электроннограммах (рисунок 11) рибосомы выглядят как частицы размером 15-20 нм, лишенные внутренней или внешней симметрии. Общий молекулярный вес целой рибосомы достигает 2,5 миллионов Дальтон. При использовании же другого показателя – *S* (так называемого «**коэффициента седиментации Сведберга**», описывающего скорость осаждения частиц при ультрацентрифугировании) бактериальная рибосома характеризуется величиной 70 S.

На электроннограммах также можно рассмотреть отдельные частицы, из которых состоит целая рибосома – большую субъединицу (16000 кДа) и малую субъединицу (900 кДа), характеризующихся коэффициентами седиментации 50S и 30S соответственно.

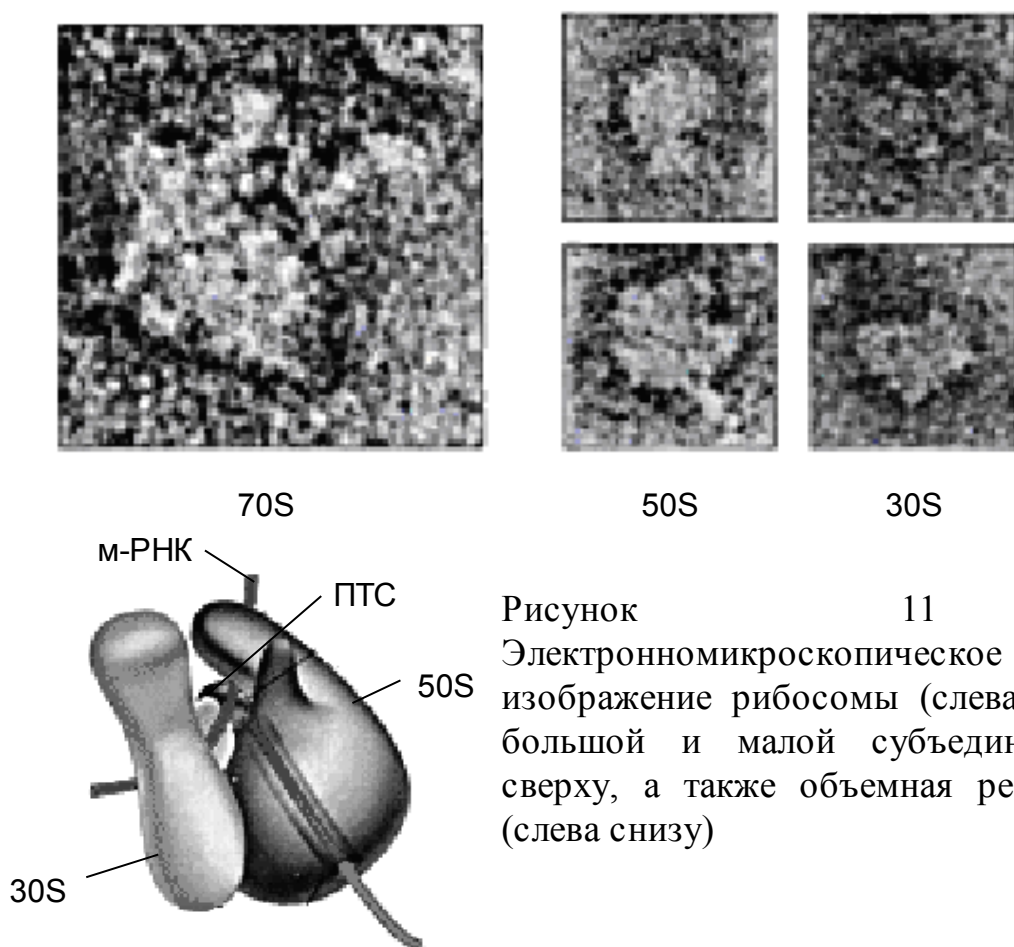


Рисунок 11 – Электронномикроскопическое изображение рибосомы (слева сверху), ее большой и малой субъединиц (справа сверху, а также объемная реконструкция (слева снизу)



Методика выполнения работы.

Зарисуйте электроннограмму бактериальной рибосомы и результаты ее объемной реконструкции. Укажите на рисунке большую и малую субъединицы рибосомы, а также участки для взаимодействия с мРНК, места расположения **пептидилтрансферазного центра (ПТС)** и выхода вновь синтезируемой полипептидной цепи.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 16, посвященную описанию структуры и функций большой и малой субъединиц рибосомы.

Таблица 16

| Сравниваемые характеристики                                                                       | Малая субъединица | Большая субъединица |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 1                                                                                                 | 2                 | 3                   |
| Молекулярный вес (кДа)                                                                            |                   |                     |
| Коэффициент седиментации                                                                          |                   |                     |
| Входящие в их структуру рРНК (указать-коэффициенты их седиментации, число нуклеотидов в молекуле) |                   |                     |
| 1                                                                                                 | 2                 | 3                   |
| Количество молекул белка, входящих в состав субъединицы                                           |                   |                     |
| Наличие А-участка                                                                                 |                   |                     |
| Наличие Р-участка                                                                                 |                   |                     |
| Наличие пептидилтрансферазного центра                                                             |                   |                     |
| Участки для связывания с факторами инициации (указать с какими)                                   |                   |                     |
| Участки для связывания с факторами элонгации (указать с какими)                                   |                   |                     |
| Участки для связывания с факторами терминации (указать с какими)                                  |                   |                     |

### Цель работы – изучить организацию полирибосомы

У прокариот (в отличие от эукариот) процессы образования матричной РНК и синтеза кодируемого ей белка не разобщены во времени. Напротив, рибосомы могут присоединяться к мРНК сразу после начала ее образования и начинать синтез белка на 5'конце РНК-транскрипта, двигаясь вслед за РНК-полимеразой, достраивающей цепь мРНК. Подобный процесс получил название **«сопряженной транскрипции и трансляции»**.

Кроме того, обычно одна молекула мРНК читается сразу несколькими рибосомами, двигающимися вдоль нее друг за другом на расстоянии примерно 80 нуклеотидов и, таким образом, независимо, но с соответствующим отставанием

синтезирующими идентичные молекулы белка. Такой динамический комплекс одной мРНК с несколькими рибосомами называется **полирибосомой**.

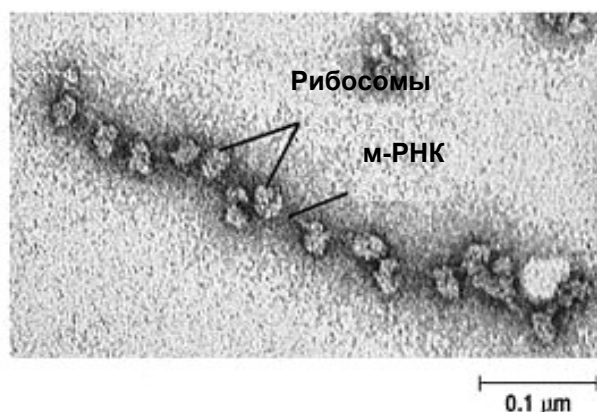


Рисунок 12 – Полирибосома (электроннограмма)

Методика выполнения работы.

Зарисуйте представленную электроннограмму полирибосомы (рисунок 12), обозначьте на ней мРНК, рибосомы, у одной из них малую и большую субъединицы; укажите предполагаемое направление перемещения рибосом по мРНК, если в верхнем левом углу электроннограммы находится ее 5'-конец, а в нижнем правом 3'-конец.

## 2.7 Система внутриклеточных мембран

Процессы превращения веществ и энергии могут идти в бактериальной клетке в двух основных пространствах: 1) в **цитозоле**, представляющем собой единый замкнутый объем, окруженный непрерывной цитоплазматической мембраной (ЦПМ); 2) на поверхности инвагинированных в цитозоль выростах этой цитоплазматической мембраны, сохраняющих свою неразрывную связь с ЦПМ, но формирующих достаточно структурированную систему **внутриклеточных мембран**, по своему функциональному назначению уже не относящуюся к группе барьерных структур бактериальной клетки, но входящих в состав ее метаболического аппарата.

При этом особенности протекания биохимических процессов в системе внутриклеточных мембран могут быть сведены к двум основным моментам. Во-первых, мембраны позволяют создавать, поддерживать и использовать трансмембранный электрохимический градиент –  $\Delta\mu\text{H}^+$ , заключающийся в неравновесном распределении протонов  $\text{H}^+$  с внутренней и на внешней стороне мембраны и определяемый ее непроницаемостью для данных мелких, но заряженных частиц. Во-вторых, в отличие от трехмерной диффузии в цитозоле, мембраны ограничивают диффузию только двумя измерениями, что не менее чем на порядок повышает вероятность фермент-субстратного взаимодействия. Этому же дополнительно способствует образование из диффундирующих в плоскости мембраны белков хорошо структурированных и стабильных олигомерных «ансамблей», в которых продукты, образуемые в одной реакции, сразу

же поступают в активные центры соседних ферментов. Последнее особенно актуально для процессов переноса электронов по расположенным в мембранах т.н. «**электроннотранспортным цепям**», как раз и ведущим к формированию упомянутого выше трансмембранного электрохимического градиента  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

**Цель работы – изучить ультраструктуру внутриклеточных мембран на примере ламелл *Nitrosococcus oceanus* (по результатам просвечивающей электронной микроскопии).**

Как сами внутриклеточные мембраны, так и особенности их тонкого строения не выявляются при световой микроскопии и могут быть исследованы только с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. При этом внутриклеточные мембраны сохраняют типичную для ЦПМ трехслойную структуру, состоящую из двух наружных электронноплотных слоев и внутреннего электроннопрозрачного слоя, но формируют в цитозоле высокоструктурированные системы.

Методика выполнения работы.

Зарисуйте электроннограмму морской нитрифицирующей бактерии *Nitrosococcus oceanus* (рисунок 13), обозначьте стопки внутриклеточных мембран (**ламелл**), цитоплазму, клеточную стенку, другие выявляемые ультраструктуры бактериальной клетки.



Рисунок 13 – Система ламелл в клетках *Nitrosococcus oceanus* (просвечивающая электронная микроскопия)

**Цель работы – дать сравнительную характеристику основным типам внутриклеточных мембран бактерий.**

Методика выполнения работы.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 17, посвященную описанию разнообразию внутриклеточных мембран.

Таблица 17

| Типы | Их морфологи- | Локализо- | Дополни-тель- | Физиологические |
|------|---------------|-----------|---------------|-----------------|
|------|---------------|-----------|---------------|-----------------|



| внутрицито-<br>плазматиче-<br>ских<br>мембран | ческая<br>организация                                                   | ванные<br>в них фер-<br>ментные си-<br>стемы | ные ассоции-<br>ро-ванные с<br>ними структу-<br>ры | группы прокариот,<br>имеющих подоб-<br>ные мембраны |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Нефотосин-<br>тетические                      | Ламеллы                                                                 |                                              |                                                    |                                                     |
|                                               | Мезосомы                                                                |                                              |                                                    |                                                     |
| Фотосин-те-<br>тические                       | Тилакоиды:<br>- везикулярные,<br><br>- тубулярные,<br><br>- ламеллярные |                                              |                                                    |                                                     |

## 2.8 Включения

В цитоплазме некоторых бактериальных клеток могут обнаруживаться особые обособленные образования, называемые **«включениями»** и выполняющие две основные функции: 1) запасание (депонирование) питательных веществ; 2) формирование у микроорганизмов определенных приспособительных функций.

Изучение морфологии приспособительных включений – аэросом и магнитосом предлагается для самостоятельного изучения, а также будет рассмотрено при изучении дисциплины «Экология микроорганизмов».

**Цель работы – освоить метод выявления включений волютина с использованием световой микроскопии.**

Возможность микроскопического выявления внутрицитоплазматических включений, состоящих из полифосфатов (линейных полимеров ортофосфата), основана на использовании явления **метахромазии** - характерного изменения цвета некоторых красителей (метиленового синего или толуидинового синего) при взаимодействии с данным веществом. В этой связи данные включения часто называют «метахроматическими» наряду с их другим названием: «волютиновые зерна», произошедшим от видового наименования микроорганизма *Spirillum volutans*, у которого они впервые были описаны.

Среди предложенных для этого методов (Мейера, Раскиной), наибольшее распространение получил метод окраски по **Нейссеру**. Для реализации данного

метода готовят специальный краситель – **краску Нейссера** путем смешивания 0,1 г метиленового синего, 2 мл 95 % спирта, 5 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл дистиллированной воды.

Процедура окрашивания:

- 1) на предметном стекле готовят мазок бактериальной культуры, который фиксируют над пламенем горелки;
- 2) предметное стекло погружают на 1 минуту в краску Нейссера;
- 3) после этого предметное стекло погружают на 1 минуту в раствор Люголя;
- 4) промывают препарат водой;
- 5) наносят на мазок каплю дополнительного красителя – хризоидина или везувина (1 г, растворенного в 300 мл кипящей дистиллированной воды и профильтрованного через бумагу), выдерживают в течение 1-3 мин;
- 6) тщательно промывают препарат водой, высушивают на воздухе и микроскопируют (тела бактериальных клеток окрашиваются в нежно-желтый цвет, а зерна волютина окрашиваются в темно-синий цвет).

Для выполнения работы приготовьте мазок исследуемой бактериальной культуры *Corynebacterium spp.*, который окрасьте в соответствии с описанной выше процедурой. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 18

Таблица 18

| Результаты микроскопии<br><i>Corynebacterium spp.</i> ,<br>окрашенной по методу Нейссера | Обозначения                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                                                                          | 1 - тела бактериальных клеток<br>2 - зерна волютина |

**Цель работы – изучить ультраструктуру включений волютина (по результатам просвечивающей электронной микроскопии).**

Тонкое строение (ультраструктура) включений может быть выявлена с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. При этом зерна волютина выявляются как округлые электронноплотные структуры размером до 500 нм, расположенные в цитоплазме на полюсах бактериальной клетки (рисунк 14).

Методика выполнения работы.

Зарисуйте электронограмму *Corynebacterium spp.*, обозначьте волютиновые зерна, цитоплазму, клеточную стенку, другие выявляемые ультраструктуры бактериальной клетки.

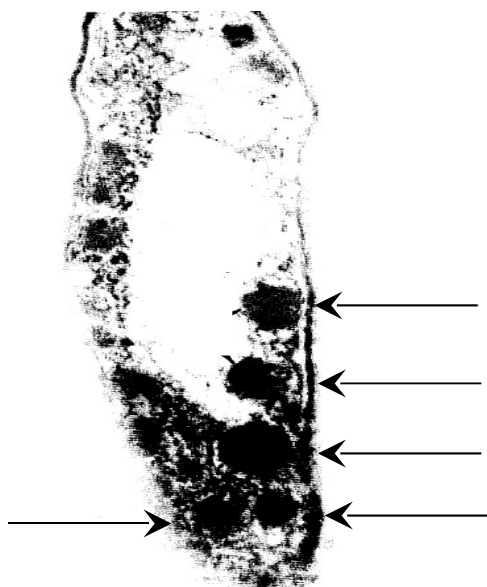


Рисунок 14 – Включения волютина в клетках *Corynebacterium spp.* (просвечивающая электронная микроскопия)

**Цель работы – дать сравнительную характеристику включений бактерий, содержащих запасные вещества**

Методика выполнения работы.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 19, посвященную описанию основных включений бактерий, содержащих запасные вещества.

Таблица 19

| Запасаемые вещества                                             | Морфология включений | Химический состав | Группы прокариот, образующих подобные включения |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------------------------|
| Полисахариды                                                    |                      |                   |                                                 |
| Жироподобные вещества (поли- $\beta$ -гидроксимасляная кислота) |                      |                   |                                                 |
| Азотистые вещества (цианофитин)                                 |                      |                   |                                                 |
| Фосфор                                                          |                      |                   |                                                 |
| Сера                                                            |                      |                   |                                                 |
| Углеводороды                                                    |                      |                   |                                                 |

### 3 Деление бактерий

Возникновение новых бактериальных клеток возможно только путем деления предсуществующих (принцип «*клетка от клетки*»). При этом вновь возникающие формы полностью наследуют особенности исходной родительской клетки и оказываются морфологически и физиологически неотличимыми от нее (принцип «*стабильности*»).

Подобным представлениям соответствует вариант **равновеликого бинарного деления**, в результате которого из одной родительской клетки образуются две ее идентичные копии. Вместе с тем для некоторых микроорганизмов характерны достаточно выраженные особенности деления, сводимые к двум основным вариантам: 1) **почкование** (неравновеликое бинарное деление); 2) **множественное деление**, каждое из которых ведет к образованию дочерних клеток, первоначально отличающихся от родительской.

**Цель работы – дать характеристику основным вариантам деления бактерий**

Методика выполнения работы.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 20.

Таблица 20

| Варианты деления бактериальных клеток | Микроорганизмы, для которых характерен подобный тип деления | Число циклов репликации хромосомы перед делением | Чередование фаз роста и деления | Идентичность вновь образующихся и родительской клетки | Количество вновь образующихся клеток |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Равновеликое бинарное деление         |                                                             |                                                  |                                 |                                                       |                                      |
| Почкование                            |                                                             |                                                  |                                 |                                                       |                                      |
| Множественное деление                 |                                                             |                                                  |                                 |                                                       |                                      |

**Цель работы – изучить особенности цитокинеза у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов**

Даже при простом бинарном делении у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов могут быть продемонстрированы существенные различия в процессе разделения вновь образуемых клеток (**цитотомии**).

Методика выполнения работы.

Рассмотрите и зарисуйте представленные электроннограммы деления грамположительного и грамотрицательного микроорганизмов (рисунок 15); основные отличия в процессе их цитотомии укажите в таблице 21.

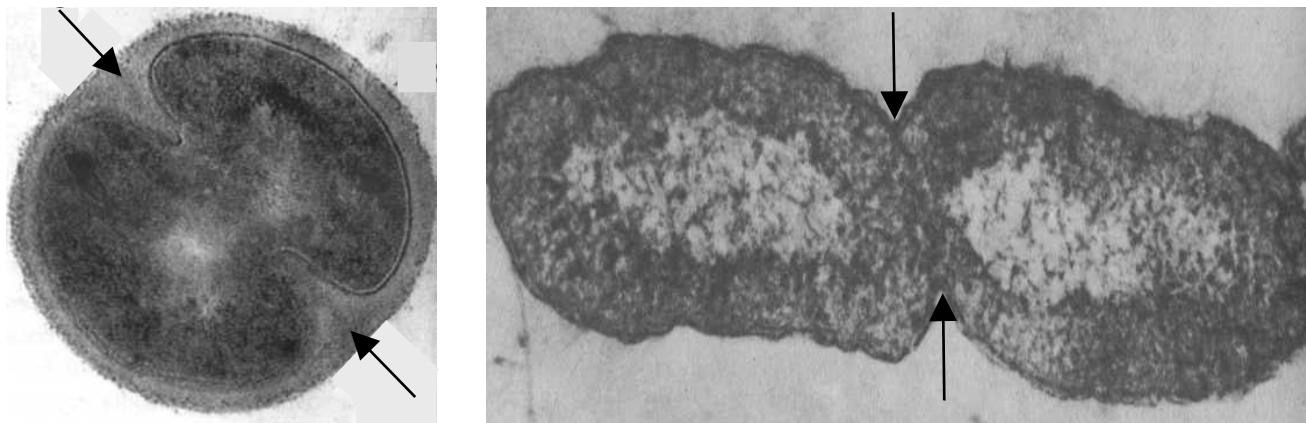


Рисунок 15 – Цитотомия грамположительных (слева) и грамотрицательных (справа) бактерий. Стрелками указана плоскость деления

Таблица 21

| Особенности деления                                                     | Гр (+) формы | Гр(-) формы |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| Инвагинация цитоплазматической мембраны                                 |              |             |
| Синтез пептидогликана с формированием «перегородки деления»             |              |             |
| Формирование «перетяжки» с вовлечением в этот процесс наружной мембраны |              |             |

**Цель работы – изучить варианты взаимного расположения бактериальных клеток в микроколонии, определяемое плоскостью деления**

В случае сохранения частичного контакта между вновь образующимися клетками возможно формирование микроколоний (агрегатов), характеризующихся определенным порядком их взаимного расположения, задаваемым плоскостью прошедшего деления. Возникающие в результате этого картины оказываются достаточно типичными для представителей определенных родов (видов) микроорганизмов и описываются понятиями «*дипло*» (попарное расположение), «*стрепто*» (расположение цепочкой); «*тетра*» (расположение трехмерными кластерами кубической формы), «*стафило*» (взаимное расположение, напоминающее гроздь винограда).

Методика выполнения работы.

Рассмотрите четыре представленных препарата, представленных коковыми формами микроорганизмов, зарисуйте результаты микроскопии в таблице 22, определите плоскости деления, ведущие к формированию наблюдаемого порядка взаимного расположения бактериальных клеток.

Таблица 22

|                                                  |                                                    |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <p><b>Диплококки</b><br/>Плоскость деления –</p> | <p><b>Стрептококки</b><br/>Плоскость деления -</p> |
| <p><b>Тетракокки</b><br/>Плоскость деления –</p> | <p><b>Стафилококки</b><br/>Плоскость деления –</p> |

#### 4 Покоящиеся формы микроорганизмов

Важной особенностью многих микроорганизмов, значимой для их длительного переживания при неблагоприятном изменении условий существования, является способность к образованию морфологически дифференцированных клеток, объединяемых общим понятием **«покоящиеся формы»**. В некоторых случаях для их образование необходимо особое неравное деление исходной родительской клетки, в других случаях в покоящееся состояние переходит обычная вегетативная клетка.

Общей морфологической особенностью покоящихся форм является **упрочение поверхностных барьерных структур**, имеющих и у обычных вегетативных клеток микроорганизмов, а также, в ряде случаев, возникновение дополнительных поверхностных образований.

Общей физиологической особенностью покоящихся форм является выраженное **угнетение процессов обмена веществ и энергии**, что сопровождается общим снижением активности метаболического, биосинтетического и генетического аппаратов бактериальной клетки. В то же время для некоторых из покоящихся форм характерно накопление ряда резервных питательных веществ (в виде включений).

Важным следствием морфофункциональных перестроек в покоящихся формах микроорганизмов является приобретение ими повышенной **устойчивости к действию разнообразных повреждающих факторов среды обитания**: высоких и низких температур, кислотности среды, радиации и др.

**Цель работы – освоить метод окраски эндоспор по Циль-Нильсену**

Микроскопическое выявление эндоспор основано на их особенностях, возникающих при спорообразовании и значимо отличающих подобные структуры от исходной родительской клетки (спорангия), внутри которой они образуются. При этом в качестве подобной особенности наиболее часто используется **кислотоустойчивость** эндоспор, определяющая различное сохранение красителя в эндоспоре и спорангии после обработке сильными обесцвечивающими реагентами.

Среди множества предложенных для этого методов (Ожешки, Битера, Шеффера-Фултона, Пешкова и др.), наибольшее распространение получил **метод Циля-Нильсена**, используемый также для окраски кислото- и спиртоустойчивых бактерий. Для реализации данного метода готовят специальный краситель – **карболовый фуксин Циля** путем смешивания 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина (1 г основного фуксина + 10 мл 96 % спирта) и 100 мл 5 % раствора карболовой кислоты.

Процедура окрашивания:

- 1) на предметном стекле готовят мазок бактериальной культуры, который фиксируют над пламенем горелки;
- 2) на мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, на который наносят каплю фуксина Циля;
- 3) предметное стекло нагревают над пламенем горелки до отхождения паров красителя, после чего остужают на воздухе;
- 4) снимают фильтровальную бумагу и ополаскивают препарат водой;
- 5) опускают предметное стекло в стаканчик с 5 % раствором серной кислоты, где тщательно прополаскивают препарат до обесцвечивания;
- 6) тщательно промывают препарат водой;
- 7) наносят на предметное стекло раствор метиленового синего и прокрашивают препарат в течение 3-5 минут;
- 8) тщательно промывают препарат водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Для выполнения работы приготовьте по 3 образца исследуемой бактериальной культуры, первый из которых доведите до этапа №4 включительно, второй до этапа №6 включительно, а третий окрасьте в соответствии со всей описанной выше процедурой. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 23.

Таблица 23

| Результаты микроскопии спорообразующих микроорганизмов после окрашивания фуксином Циля (этап №4) | Результаты микроскопии спорообразующих микроорганизмов после обесцвечивания серной кислотой (этап №6) | Результаты микроскопии спорообразующих микроорганизмов после окрашивания по методу Циля-Нильсена |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                  |                                                                                                       |                                                                                                  |

|                                  |                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Цвет спор –<br>Цвет спорангиев - | Цвет спор –<br>Цвет спорангиев - | Цвет спор –<br>Цвет спорангиев - |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|

На основании полученных результатов дайте характеристику основных компонентов, используемых в методе окраски по Циль-Нильсену в таблице 24

Таблица 24

| Наименование компонентов                                                             | Функциональное назначение* | Результат воздействия |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Карболовый фуксин Циля                                                               |                            |                       |
| 5% серная кислота                                                                    |                            |                       |
| Метиленовый синий                                                                    |                            |                       |
| * варианты: основной краситель, дополнительный краситель, дифференцирующий компонент |                            |                       |

**Цель работы – изучить ультраструктуру эндоспор (по результатам просвечивающей электронной микроскопии).**

Тонкое строение (ультраструктура) эндоспор может быть выявлена с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. При этом в структуре споры может быть выявлена компактизированная цитоплазма (протопласт споры), внутренняя (цитоплазматическая) мембрана, кортекс, представляющий собой утолщенный многослойный пептидогликан, характеризующийся высокой степенью поперечной сшитости, внешняя мембрана, а также белковый спорный покров.

Методика выполнения работы.

Зарисуйте строение споры *Clostridium tetani* (рисунок 17), дайте определение цифровым обозначениям, укажите наличие или отсутствие подобных структур у обычных вегетативных клеток данного микроорганизма.

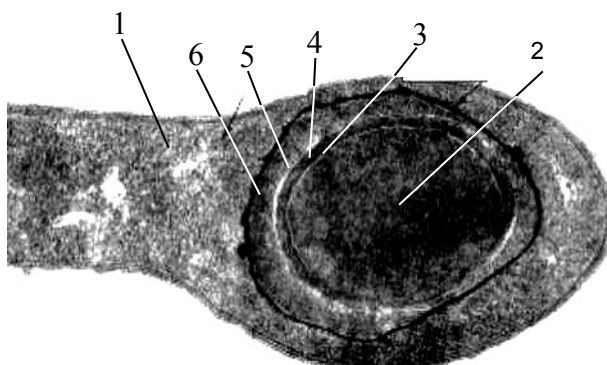


Рисунок 17 – Эндоспора *Clostridium tetani* (просвечивающая электронная микроскопия).

**Цель работы – дать сравнительную характеристику покоящимся формам бактерий**



Методика выполнения работы.

На основании данных, изложенных в учебной литературе и представленных в лекционном материале заполните таблицу 25.

Таблица 25

| Типы покоящихся клеток | Образующие их микроорганизмы | Возникновение в результате деления особого типа | Дополнительные поверхностные структуры, отсутствующие у вегетативных клеток | Вещества, накапливаемые в протопласте | Уровень устойчивости к экстремальным факторам |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Эндоспоры              |                              |                                                 |                                                                             |                                       |                                               |
| Экзоспоры              |                              |                                                 |                                                                             |                                       |                                               |
| Цисты                  |                              |                                                 |                                                                             |                                       |                                               |
| Акинеты                |                              |                                                 |                                                                             |                                       |                                               |

## 5 Литература, рекомендуемая для изучения темы

5.1 **Албертс, Б.** Молекулярная биология клетки: в 3-х т. / Б Альбертс [и др.]. – М.: Мир, 1993. – 343 с.

5.2 **Громов, Б.В.** Строение бактерий / Б.В. Громов. – Л.: Изд-во ЛГУ., 1985. – 321 с.

5.3 **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: ИКЦ «Академия», 2003. – 462 с.

5.4 **Дерябин, Д.Г.** Функциональная морфология клетки / Д.Г. Дерябин. – М.: КД «Университет», 2005. – 211 с.

5.5 **Егорова, О.В.** С микроскопом на «ты». Шаг в XXI век. Световые микроскопы для биологии и медицины / О.В. Егорова. - М.: РепроЦентр, 2006. – 145 с.

5.6 Современная микробиология. Прокариоты: в 2-х т. / под ред. Г. Шлегеля, И. Ленгелера, Г. Девса. – М.: Мир, 2005. – 493 с.

5.7 **Миронов, В.Л.** Основы сканирующей зондовой микроскопии / В.Л. Миронов. – М.: Техносфера, 2005. – 278 с.

5.8 **Нетрусов, А.И.** Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: ИКЦ «Академия», 2005. – 355 с.

5.9 **Нетрусов, А.И.** Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. - М.: ИКЦ «Академия», 2006. – 290 с.

5.10 **Пантелеев, В.** Компьютерная микроскопия / В. Пантелеев, О. Егорова, Е. Клыкова. - М.: Техносфера, 2005. – 300 с.

5.11 **Спенс, Дж.** Экспериментальная электронная микроскопия высокого разрешения / Дж. Спенс. – М.: Наука, 1986. – 320 с.

5.12 **Ченцов, Ю.С.** Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004 – 495 с.

## **Приложение А** **(справочное)**

### **Вопросы к зачету по дисциплине «Цитология микроорганизмов»**

- 1 Сравнительная характеристика про- и эукариот.
- 2 Представления о доменах архебактерий, эубактерий и эукариот. Их сравнительная характеристика.
- 3 Представления об основных структурно-функциональных подсистемах клетки.
- 4 Обязательные и необязательные структуры прокариотической клетки.
- 5 Четыре типа прокариотических клеток, отличающихся по строению клеточной стенки.
- 6 Липиды цитоплазматической мембраны. Особенности липидов архебактерий.
- 7 Разновидности белков цитоплазматической мембраны. Типы транспорта через ЦПМ.
- 8 Сравнительная характеристика муреина эубактерий и псевдомуреина архебактерий. Этапы биосинтеза муреина.
- 9 Строение клеточной стенки архебактерий.
- 10 Строение клеточной стенки грамположительных эубактерий.
- 11 Строение клеточной стенки грамотрицательных эубактерий.
- 12 Капсулы, чехлы, слизи и внеклеточный матрикс.
- 13 Строение и функционирование жгутика. Понятие о таксисах.
- 14 Двигательные структуры спирохет и цианобактерий.
- 15 Строение генетического аппарата прокариот. Понятие о «нуклеоиде» и «бактериальной хромосоме». Принципы укладки бактериальной хромосомы.
- 16 Механизмы синтеза мРНК.
- 17 Организация белоксинтезирующего аппарата прокариот. Строение рибосом. Особенности рибосом архебактерий.
- 18 Предрибосомальный этап синтеза белка. Строение и функция тРНК.
- 19 Рибосомальный этап синтеза белка у прокариот. Молекулярные механизмы инициации, элонгации и терминации трансляции. Понятие о «сопряженной транскрипции-трансляции».
- 20 Организация метаболического аппарата прокариот. Типы внутриклеточных мембран прокариот.

21 Фотосинтетические мембраны прокариот. Структурная основа анаэробного фотосинтеза у пурпурных бактерий и окислительного фотосинтеза у цианобактерий.

22 Молекулярные механизмы фотосинтеза у археобактерий.

23 Нефотосинтетические мембраны прокариот. Структурная основа дыхания бактерий. Мезосомы.

24 Разнообразие включений у прокариот.

25 Жизненный цикл прокариотической клетки. Обязательные и необязательные фазы жизненного цикла.

26 Деление прокариотической клетки. Молекулярные механизмы репликации ДНК. Варианты деления. Особенности деления у грамположительных и грамотрицательных эубактерий.

27 Сравнительная характеристика покоящихся форм прокариот.

28 Эндоспоры, этапы их образования. Молекулярные сигналы, запускающие процесс спорообразования у представителей рода *Bacillus*.

29 Морфологически дифференцированные вегетативные клетки. Молекулярно-генетические механизмы их возникновения. Понятие об «эффекте кворума».

30 Роль прокариот в возникновении высших форм жизни. Теория симбиогенеза и ее основные доказательства.