

1. Принципы организации и особенности работы в микробиологической лаборатории. Стерилизация и дезинфекция.

Микробиологический словарь: автоклав, микроанаэроостат, сухо-жаровой шкаф, термостат, бактериальная петля, чашка Петри, питательные среды, стерилизация, тиндализация, дезинфекция.

1.1. Устройство микробиологической лаборатории.

Микробиологическая лаборатория должна состоять как минимум из трех помещений: комната, в которой проводят предварительную подготовку материала и оборудования для проведения микробиологических исследований; комната для работы с чистыми культурами микроорганизмов – бокс; автоклавная – специально оборудованное помещение, для проведения стерилизации материала и питательных сред; моечная комната. Микробиологическая лаборатория должна быть укомплектована приборами и оборудованием, необходимым для работы с разными группами микроорганизмов с учетом их биологии, а также для проведения исследований и выполнения микробиологических анализов разных материалов.

Минимальный набор приборов и оборудования для полноценного функционирования лаборатории микробиологического профиля должен состоять из: автоклава (прибор, который работает под давлением и используется для стерилизации разных материалов), сухо-жарового шкафа (прибор, который может поддерживать температуру до 200°C и используется для стерилизации стеклянной посуды), термостата (прибор, который поддерживает постоянную заданную температуру в течение определенного интервала времени), микроанаэроостата (прибор для выращивания анаэробных микроорганизмов), ламинарного шкафа (прибор, который используется для пересева культур микроорганизмов), водяной бани, люминостажной камеры для выращивания фототрофных микроорганизмов, весов, электрических шейкеров; микробиологических пробирок, колб, цилиндров разной формы и объема, пипеток разного объема, чашек Петри разного диаметра, стеклянных леек, стеклянных стекол с лунками и без – все эти предметы должны быть изготовлены из термостойкого стекла; бактериальных петель, иголок, металлических и стеклянных шпателей, ватно-марлевых и резиновых пробок; приборов для фильтрования (прибор Зейтца, бактериальные фильтры разной конструкции и т.д.). Если в лаборатории используется одноразовая пластиковая микробиологическая посуда (пробирки, пипетки, чашки Петри), необходимо наличие специального оборудования для его дезинфекции и утилизации.

1.2. Питательные среды для выращивания микроорганизмов.

Любому организму для роста и развития необходимо получать из окружающей среды вещества, необходимые для синтеза необходимых компонентов клетки и получения нею энергии. Микроорганизмы не являются исключением из этого правила, поэтому питательные среды для их выращивания должны содержать все необходимые вещества в достаточном количестве. Так как клетки микроорганизмов на 85% состоят из воды, в питательных средах необходимо достаточное количество этого вещества. В состав сред входят макро- и микроэлементы. К макроэлементам относятся углерод, азот, фосфор, сера, калий и натрий, на долю этих элементов приходится до 95% сухого вещества клетки. К микроэлементам относятся кальций, железо, магний, хлор, цинк, медь и некоторые

другие элементы. В основном все необходимые металлы микроорганизмы получают в виде катионов неорганических соединений, если среды готовят на отстоянной кипяченой водопроводной воде, микроэлементы можно не добавлять, так как они в следовых количествах содержатся в ней. В зависимости от способа жизнедеятельности микроорганизмы должны получать углерод, азот и серу в определенной химической форме. Так, для автотрофов углерод необходимо давать в виде CO_2 , для гетеротрофов – в виде определенных органических соединений, азот и серу – в виде аминокислот или продуктов распада белков – пептонов, для определенных групп микроорганизмов – азот и сера должны быть в виде неорганических соединений – молекулярного азота, нитратов, аммиака, сульфатов, сероводорода. Также для определенных микроорганизмов необходимы факторы роста (органические соединения, которые используются как предшественники синтеза других соединений, компонентов клетки) – аминокислоты, пурины, пиримидины, витамины. Так как микроорганизмы делят на аэробные и анаэробные, для первых необходимо присутствие в среде кислорода, для других, наоборот, необходимо создать бескислородную среду. Питательные среды по составу делятся на натуральные (в состав них входят компоненты растительного или животного происхождения, которые используются в виде экстрактов, бульонов настоек), синтетические (химически чистые соединения в определенных концентрациях, которые смешивают в определенной последовательности) и полусинтетические (природные по происхождению, но содержат определенные компоненты в определенных количествах). По консистенции питательные среды делят на жидкие (водные растворы органических и неорганических соединений) и твердые – раствор органических и неорганических соединений с добавлением гелеобразователей (микробиологического агар-агар – полисахарид, который получают из водорослей, желатин – продукт денатурации коллагена, вещество животного происхождения). В микробиологической практике часто используют следующие питательные среды: мясная вода (настой свежего измельченного мяса на водопроводной воде), мясо-пептонный бульон – МПБ (отвар свежего измельченного мяса, или смесь мясной воды с пептоном и NaCl), мясопептонный агар (смесь МПБ и агар-агара), мясо-пептонная желатина (смесь МПБ и желатины), сусло-агар (смесь неохмеленного пивного сусла и агар-агара), среда Чапека, Бредмана, Мейера, Гетчинсона (минеральные среды), а также молочная, картофельная вода, кусочки стерильных овощей,, натуральные соки.

1.3. Стерилизация и дезинфекция. Методы стерилизации.

Стерилизация – полное уничтожение всех живых микроорганизмов в различных материалах, средах, предметах.

Методы стерилизации делят на тепловые и холодные. К тепловым методам относятся: стерилизация кипячением, стерилизация паром под давлением (автоклавирование), стерилизация текучим паром (тиндализация), стерилизация сухим жаром (в сухо-жаровых шкафах), стерилизация в пламени горелки или спиртовки, пастеризация (неполная стерилизация). Холодные методы стерилизации делятся на: физические (УФ облучение, фильтрование) и химические (обработка поверхностей химическими соединениями – 70% этиловый спирт, фенол, хлорсодержащие соединения).

Дезинфекция – уничтожение организмов, в том числе и патогенных специальными методами (химические, физические, биологические).

2. Морфология бактерий.

Приготовление фиксированных окрашенных микробиологических препаратов.

Микробиологический словарь: морфология бактериальной клетки, мазок, фиксирование мазка, красители, иммерсионная система микроскопа.

2.1. Формы бактерий.

В настоящее время известны следующие формы бактериальных клеток:

1. Шаровидные (кокки) подразделяются на микрококки (после деления клетки расходятся, агрегации не образуют), диплококки (соединены попарно), тетракокки (соединены по 4), стрептококки (образуют цепочки разной длины), стафилококки (образуют агрегации в виде виноградной грозди) и сарцины (образуют пакеты по 8-16-32 клеток);

2. Палочковидные (цилиндрические) – длина клетки в несколько раз превышает ширину, могут иметь заостренную, закругленную, срезанную форму краев клеток, подразделяются на бактерии (не образуют спор) и бациллы (образуют эндоспоры), которые могут быть парами (диплобактерии и диплобациллы) или образовывать цепочки (стрептобактерии и стрептобациллы)

3. Извитые формы подразделяются на вибрионы (имеют вид запятой), спириллы (клетки имеют 1-10 завитков), спирохеты (имеют больше 10 завитков)

4. Бактерии, имеющие необычную форму клеток: тороидные (в форме замкнутого или незамкнутого кольца), простекобактерии (клетка имеет выросты), звездчатые, треугольные и квадратные.

2.2. Изготовление микробиологического препарата.

1. Приготовление мазка. На чистое обезжиренное предметное стекло нанести небольшую каплю дистиллированной воды, в нее с помощью стерильной бактериальной петли внести небольшое количество микроорганизма и распределить по поверхности стекла. Мазок должен быть тонким диаметром примерно 1 см.

2. Высушивание мазка. Проводят без нагревания, при комнатной температуре до полного испарения воды с поверхности предметного стекла.

3. Фиксация мазка. Проводят с целью:

- убить микроорганизмы, чтобы сделать безопасной дальнейшую работу с ними;
- прикрепить мазок к поверхности стекла, чтобы он не смылся при дальнейших манипуляциях;
- разрушить целостность поверхностных структур клетки для лучшего окрашивания.

Мазок фиксируют в пламени горелки при этом стекло держат мазком вверх и 3-4 раза проносят сквозь пламя горелки.

4. Окрашивание мазка. Может быть простым (используется один краситель) и дифференциальным (используются несколько красителей в определенной последовательности). На охлажденный после фиксации мазок пипеткой наносят несколько капель красителя (мазок должен быть полностью покрыт слоем красителя), при этом пипеткой не прикасаться к поверхности стекла.

5. Промывание мазка. Проводят дистиллированной водой до «чистой воды», т.е. с поверхности стекла должна стекать прозрачная вода.

6. Высушивание мазка. Промытое стекло тщательно вытирают с нижней стороны фильтровальной бумагой. А с другой стороны аккуратно промокнуть воду с остатками красителя и высушить на воздухе.

2.3. Порядок работы с микроскопом (с использованием иммерсионной системы).

1. Поместить препарат на предметный столик микроскопа.
2. На малом увеличении найти исследуемый объект в поле зрения.
3. Нанести на предметное стекло каплю иммерсионного масла. Перевести на иммерсионный объектив (объектив имеющий черную полосу).
4. Установить объектив так, чтобы нижняя линза была погружена в масло.
5. После окончания работы поднять тубус микроскопа и ватой смоченной спиртом снять остатки масла с иммерсионного объектива.

2.4. Изучение морфологии бактерий на примере *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

Ход работы:

1. Приготовить мазок культуры *Bacillus subtilis* (сенная палочка), высушить, зафиксировать в пламени горелки и окрасить простым способом красителем метиленовым синим (время окраски 3-5 минут), промыть и высушить.

2. Приготовить мазок культуры *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый), высушить, зафиксировать в пламени горелки и окрасить простым способом красителем фуксин (время окраски 1-2 минуты), промыть и высушить.

3. На оба препарата нанести иммерсионное масло и рассматривать с помощью иммерсионной системы микроскопа.

4. Сделать схематические рисунки изучаемых микроорганизмов.

3. Грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Микробиологический словарь: *грамположительные и грамотрицательные бактерии, клеточная стенка.*

Прокариоты можно разделить на две группы – грамположительные и грамотрицательные. В 1884 году датский ученый Г. К. Грам предложил дифференциальный метод окраски бактерий, по которому одни бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет (грамположительные), а другие в красный или розовый (грамотрицательные). Суть данного метода состоит в том, что комплекс генциан – фиолетового красителя с йодом после обработки мазка спиртом удерживается клеточными покровами одних бактерий и вымывается из других. Поэтому для их определения используют дополнительный краситель, а для облегчения дифференциации выбирают контрастный – красный. Способность окрашиваться или неокрашиваться в сине-фиолетовый цвет отображает физические способности клеточной стенки микроорганизмов. Рассматриваются разные теории, объясняющие дифференциальное окрашивание бактерий по Граму (химическая, мембранная, изоэлектрическая). Согласно современным представлениям, после проникновения в клетки растворимая хлорная форма генциан-виолета переходит в нерастворимую форму и выпадает в осадок, при этом

окрашивается цитоплазма клетки. При обработке препарата растворителем (этиловый спирт, ацетон) из цитоплазматической мембраны экстрагируются липиды, это приводит к увеличению ее пористости. Таким образом, мембрана не препятствует вымыванию комплекса генциан-виолет-йод. Однако обычно клетка имеет муреиновый слой (разной толщины и пористости у разных бактерий), который характеризуется высокой стойкостью к органическим растворителям. Многослойный малопористый муреиновый слой не дает красителю вымываться из клеток – клетки окрашиваются в сине-фиолетовый цвет (грамположительные), в случае наличия монослоя муреина с крупными порами, клетки окрашиваются в красный цвет (грамотрицательные). Следует отметить, что характер окрашивания прокариот по Граму зависит от возраста культуры, факторов внешней среды.

3.1. Дифференциальный способ окрашивания бактерий по Граму (классический).

Классический способ окрашивания, предложенный Грамом, был доработан и модифицирован многими учеными, также существует экспресс-метод (живая культура бактерий образует слизь при обработке 3% КОН в течение 5-10 секунд).

Ход работы.

1. На одном предметном стекле **по очереди** приготовить мазки *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка).
2. На зафиксированные в пламени горелки мазки положить небольшие кусочки фильтровальной бумаги и на них нанести генциан – фиолетовый краситель, так чтобы кусочки бумаги полностью покрылись красителем.
3. Через 5-7 мин. окрашенную бумагу снять и препарат окрасить раствором Люголя – 1 мин., при этом препарат потемнеет.
4. Раствор Люголя слить и препарат обработать 96% этиловым спиртом – 30–60сек.(нанести несколько капель спирта, подождать 10–15 сек., слить процедуру повторить 2–3 раза, в зависимости от толщины мазка и интенсивности предыдущего окрашивания).
5. Препарат промыть до « чистой воды».
6. Докрасить препарат фуксином, 1-2 мин.
7. Краситель смыть водой, препарат высушить и микроскопировать с иммерсионным маслом.
8. Определить, какая из предложенных культур грамположительная, а какая грамотрицательная, если известно, что *Bacillus mesentericus* – спорообразующая бактерия, в поле зрения будут слабоокрашенные овальные тельца – споры, также бактерия образует длинные цепочки клеток. Кишечная палочка спор не образует, редко в поле зрения могут встречаться короткие цепочки по 2-3 клетки.
9. Сделать схематический рисунок.

4. Генетический аппарат бактериальной клетки.

Микробиологический словарь: нуклеоид, бактериальная хромосома, бактериальные плазмиды.

Как известно, главное отличие прокариотных организмов от эукариотных – отсутствие оформленного ядра, однако генетический материал обеих групп представлен ДНК. Структура, которая у прокариот выполняет функцию носителя генетической

информации называется нуклеоид и представляет собой замкнутую молекулу ДНК (бактериальная хромосома), хотя иногда встречаются линейные хромосомы. Бактериальная хромосома компактно упакована, в ней можно выделить как суперсперализованные так и деспирализованные участки ДНК; стабильность такой упаковки поддерживается белками и молекулами РНК. В одной бактериальной клетке может насчитываться до 9 копий хромосом, но нуклеоид в клетке один. Кроме нуклеоида в клетке можно наблюдать необязательные структуры, бактериальные плазмиды – небольшие, замкнутые в кольцо, участки ДНК. Плазмиды, не связаны с нуклеоидом, несут информацию про дополнительные свойства организма и при делении бактерии передаются к одной из дочерних клеток.

4.1. Окрашивание ядерных элементов методом Романовского-Гимзе.

Так как прокариотные организмы имеют очень маленькие размеры, для облегчения процедуры микроскопирования генетического материала, рекомендуется окрашивать ядерный материал эукариотного организма, например дрожжей.

Ход работы.

1. Приготовить мазок *Saccharomyces cerevisiae* и высушить при комнатной температуре.
2. Зафиксировать мазок в жидкости Карнуа в течение 15 мин.
3. На высушенный зафиксированный мазок нанести краситель Романовского и продержать 40-45 мин в термостате при температуре 37°C.
4. Промыть препарат водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсионным маслом.
5. В поле зрения – овальные клетки, в которых цитоплазма окрашена в розовый цвет, а ядерный материал – в фиолетовый.
6. Сделать схематический рисунок с обозначением ядерного материала

5. Клеточные включения микроорганизмов.

Микробиологический словарь: включения микроорганизмов, запасные питательные вещества, волютин, гранулеза, поли-β-оксимасляная кислота, параспоральные тельца.

К внутриклеточным включениям микроорганизмов относятся запасные вещества (гликоген, крахмал, гранулеза, белковые кристаллы, волютин, жиры, сера) и продукты метаболизма.

Запасные полифосфаты (волютин, метахроминовые зерна, тельца Бабеша-Ернста, сейчас наиболее часто употребляется название – полифосфатные гранулы). Впервые были найдены у бактерий *Spirillum volutans*. Это запасные питательные вещества микроорганизмов в виде округлых телец диаметром от 50 нм до 1 мкм, которые состоят из конденсированных неорганических фосфатов. Полифосфаты используются клеткой для биосинтеза фосфолипидов и нуклеиновых кислот, а в случае дефицита АТФ – фосфорильная группа переносится на АДФ и АМФ. Таким образом, полифосфатные гранулы являются макроэргичными соединениями, которые ассимилируют энергию. В клетках полифосфаты определяются благодаря способности к метахромазии (изменение цвета), при окрашивании этих структур синими красителями дают красно-фиолетовое окрашивание. Полифосфатные гранулы встречаются у многих микроорганизмов – азотобактер, сенной палочки, в клетках молочнокислых бактерий и дрожжей, а также у некоторых патогенов – возбудителей дифтерии, сибирки. Следует отметить, что у

бактерий гранулы находятся в цитоплазме, чаще всего в центре клетки, а в клетках дрожжей – в вакуолях.

Запасные полисахариды – источник энергии, в клетках микроорганизмов могут находиться в виде зерен крахмала (цианобактерии), гранулезы – крахмалоподобного вещества (аэробные спорообразующие палочки), или гликогена (бациллы, дрожжи, энтеробактерии). Животный крахмал, гликоген, в клетках прокариот накапливается в виде гранул сферической формы диаметром до 100 нм.

Жироподобные вещества – источник углерода и энергии, образуются в клетках в результате жирового перерождения цитоплазмы при старении культуры или при выращивании культуры в условиях излишка углерода и дефицита азота. Откладываются в клетках в виде гранул диаметром до 1 мкм, представляют собой капли поли- β -оксималяной кислоты, окруженные белковой мембраной и встречаются исключительно у прокариотных организмов. Кроме гранул поли- β -оксималяной кислоты в клетках микроорганизмов могут откладываться липиды в виде воска (сложные эфиры жирных кислот и спиртов), это свойственно дрожжам, нокардиям и другим актинобактериям.

Белковые кристаллы – структуры, которые формируются некоторыми видами спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, имеют кубическую или тетрагональную форму, в клетках находятся возле споры, поэтому названы – параспоральные тельца. Установлено, что белок, из которого образуются данные структуры вызывает интоксикацию вредных насекомых, поэтому чистые культуры бактериальных штаммов-продуцентов белковых кристаллов используют для приготовления препаратов-инсектицидов.

5.1. Окрашивание волютина.

Ход работы.

1. Приготовить мазок *Prodotorula sp.*, высушить и зафиксировать в пламене горелки.
2. На фиксированный мазок нанести синьку Леффлера на 5-6 мин.
3. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсией.
4. Найти в поле зрения овальные клетки, в которых цитоплазма окрашена в голубой цвет, а зерна волютина в красно-фиолетовый.
5. Сделать схематический рисунок.

5.2. Окрашивание гликогена.

Ход работы.

1. Приготовить мазок *Bacillus subtilis* и высушить при комнатной температуре.
2. Мазок зафиксировать 96% этиловым спиртом, для этого на сухой мазок нанести несколько капель спирта и дождаться полного его испарения.
3. На фиксированный спиртом мазок нанести 1-2 капли раствора Люголя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости удалить фильтровальной бумагой и через 10 мин. Препарат микроскопировать с иммерсией.
4. Найти в поле зрения окрашенные в желто-зеленый цвет палочки, в середине которых находятся гранулы гликогена, окрашенные в коричневый цвет.
5. Сделать схематический рисунок.

5.3. Окрашивание жиров.

Ход работы.

1. На предметное стекло нанести небольшую каплю жидкой культуры *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Добавить каплю красителя Судан III и перемешать бактериальной петлей.
3. Каплю накрыть покровным стеклом и через 10-15 мин. микроскопировать с иммерсией.
4. Найти в поле зрения овальные клетки, в которых цитоплазма не окрашена, а липиды окрашены в оранжево-красный цвет.
5. Сделать схематический рисунок.

5.4. Окрашивание белковых кристаллов.

Ход работы.

1. Приготовить мазок *Bacillus thuringiensis*, высушить и зафиксировать в пламене горелки.
2. Зафиксированный мазок окрасить фуксином в течение 2-3 мин.
3. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсией.
4. Сделать схематический рисунок с обозначением параспоральных телец.

6. Движение бактерий.

Микробиологический словарь: бактериальные жгутики, жгутиковая нить, базальное тельце, плавающее и скользящее движение.

Бактерии делятся на подвижные (представители родов *Vibrio*, *Proteus*, *Sphaerotilus*, *Leptotrix*, *Spirochaeta*) и неподвижные (например, виды родов *Staphylococcus*, *Shigella*, *Klebsiella*). К движению способны бактерии, которые имеют жгутик (плавающий тип движения) и бактерии, лишенные жгутика, но способные передвигаться другим способом, например при контакте с плотным субстратом (скользящий тип движения). Способность бактерий к активному движению была описана в 1676 году А. Левенгуком, а в 1876 году Р. Кох сфотографировал жгутики и предложил метод их окрашивания. Жгутиковый аппарат бактерий состоит из белковых структур – нитки, крюка и базального тельца. Нитка жгутика выступает над поверхностью бактериальной клетки, далее возле поверхности клетки она соединяется с крюком, который в свою очередь с базальным тельцем, которое полностью погружено в клеточные покровы и частично – в цитоплазму. В состав базального тельца входит ось с нанизанными на нее кольцами – у грамотрицательных бактерий это кольцо L (встроено во внешнюю мембрану), кольцо P (находится в муреиновом слое) MS-кольцо (интегрировано в ЦПМ) и кольцо C (частично интегрировано в ЦПМ, частично погружено в цитоплазму). Также базальная структура имеет секреторную систему, по которой экспортируются белковые субъединицы для сборки жгутикового аппарата. Функцией первых двух колец является поддержание оси базальной структуры. Кольцо MS является элементом, к которому прикрепляются субъединицы оси, ротора, переключателя направления вращения и компоненты экспортного аппарата. С-кольцо выполняет функцию переключателя направления вращения клетки. У грамположительных бактерий отсутствуют L и P кольца. Движение жгутиков выполняется благодаря «мотору», который входит в состав базального тельца, а

точнее благодаря его основному компоненту – ротору, который локализован в MS-кольце. Вращение ротора «мотора» обеспечивается трансмембранной протондвижущей силой (или как исключение, энергией градиента катионов натрия), энергия АТФ при этом не используется. Но энергия АТФ используется на построение компонентов жгутикового аппарата и на работу регуляторных систем клетки, которые обеспечивают вращение жгутиков – по часовой стрелке или против.

6.1. Наблюдение за движением бактерий.

Исследовать жгутики бактерий в световой микроскоп достаточно сложно, это связано с их размером (длина – до 15 мкм, а диаметр – 12-18 нм). Легче наблюдать движение бактерий в жидкой среде.

Приготовление накопительной культуры маслянокислых бактерий.

Маслянокислые бактерии (представители рода *Clostridium*) сбраживают углеводы и некоторые органические кислоты до масляной и уксусной кислот, H_2 и CO_2 . Клостридии – подвижные (перитрихи) анаэробные бактерии, которые населяют почву и образуют споры по клостридиальному и плектридиальному типам.

Ход работы.

1. Измельчить сырую нечищеную картошку
2. Пробирку заполнить кусочками сырой картошки на 1/3.
3. Для нейтрализации среды добавить небольшое количество мелового порошка.
4. Смесь залить водопроводной водой, перемешать, закрыть пробкой.
5. Пробирку пастеризовать на водяной бане при $80^{\circ}C$ в течение 20 мин.
6. После пастеризации пробирки поставить в термостат при температуре $30^{\circ}C$ на несколько дней.

Приготовление препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля».

Данные типы препаратов используются для наблюдения за живыми бактериями, в том числе и подвижными. Для приготовления таких препаратов используют обезжиренные предметные и покровные стекла, а также предметные стекла с лунками.

Метод «раздавленной капли».

Ход работы.

1. На предметное стекло при помощи пипетки нанести небольшую каплю жидкости, которая содержит бактерии, в данном случае – бродильную жидкость с клостридиями.
2. К капле добавить каплю раствора Люголя и накрыть покровным стеклом, так чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Излишки жидкости удалить фильтровальной бумагой.
3. Препарат микроскопировать под объективом 40х. В поле зрения – подвижные палочковидные клетки желтовато-зеленоватого цвета.
4. Сделать схематический рисунок.

Метод «висячей капли».

Ход работы.

1. На покровное стекло нанести небольшую каплю жидкости, которая содержит бактерии.
2. По углам покровного стекла при помощи препаровальной иглы нанести небольшое количество вазелина.
3. Покровное стекло накрыть предметным с лункой. Предметное стекло с приклеенным к нему покровным аккуратно переворачивают покровным стеклом вверх.
4. Препарат микроскопировать под объективом 40х. В поле зрения – подвижные палочковидные клетки желтовато-зеленоватого цвета.
5. Сделать схематический рисунок.

7. Эндоспоры бактерий.

Микробиологический словарь: эндоспоры; *бациллярный, кластридиальный, плектридиальный* типы спорообразования; *терморезистентность спор.*

К образованию спор способно небольшое количество бактерий. Эндоспоры образуют представители небольшого количества родов (приблизительно 10) и преобладают клетки с цилиндрической формой клеток, например бактерии родов *Bacillus, Clostridium, Amphibacillus, Sulfobacillus* как исключение спорообразующие бактерии рода *Sporosarcina*, которые имеют шаровидную форму клеток. Споры бактерий в отличие от спор эукариот, не являются способом размножения, они образуются эндогенно, то есть в середине материнской клетки и могут иметь центральное, субтерминальное (приконцевое) или терминальное (концевое) положение. Диаметр споры может не превышать ширину материнской клетки (бациллярный тип при центральном и субтерминальном положениях), а может превышать (кластридиальный тип при центральном или субтерминальном положении, плектридиальный тип – при терминальном положении). Существовало мнение, что у бактерий споры образуются исключительно в ответ на неблагоприятные условия среды, сейчас же большинство ученых придерживаются мнения, что эндоспоры – это один из этапов развития популяции, хотя эта стадия не обязательная. Эндоспоры, в отличие от вегетативных клеток бактерий, более устойчивые к повышенным температурам (даже до 140°C), излучения и действия химических веществ. Споры содержат до 90% воды вегетативной клетки, однако вода находится в связанном состоянии, существовало мнение, что споры не содержат воды. Терморезистентность спор связывают с содержанием дипиколиновой кислоты, которой нет в вегетативных клетках; стойкость к действию химических веществ и излучения связывают с многослойными оболочками.

Спорообразование контролируется более чем 150 генами, при этом каждый этап образования спор контролируется определенным опероном. Процесс спорообразования начинается с уплотнения цитоплазмы вокруг нуклеоида, далее начинается процесс образования проспоры, при цитоплазматическая мембрана инвагинирует, и в результате под клеточной стенкой образуются разные по размеру две структуры, окруженные мембранами. На следующем этапе цитоплазматическая мембрана большей части окружает меньшую часть – формируется проспора (структура, окруженная двойной мембраной в середине материнской клетки). Далее обе мембраны начинают синтез оболочек споры, а у большинства видов между мембранами формируется еще одна оболочка – кортекс. Кроме кортекса формируются внутренняя и внешняя оболочки споры, а также экзоспориум. После того, как спора полностью

сформировалась, наступает лизис материнской клетки. Период покоя бактериальных спор может длиться от нескольких часов до сотен лет.

7.1. Окрашивание спор по методу Пешкова.

Ход работы.

1. На фиксированный мазок культуры спорообразующей бактерии *B.subtilis*, *Clostridium sp.* Нанести достаточное количество синьки Леффлера и довести до кипения в пламени горелки, при этом стекло сначала прогревают над пламенем горелки по всей длине, а потом задерживают на 7-10 сек. над пламенем горелки, так чтобы оно прикасалось к стеклу. После нагревания стекло не кладут на холодные предметы, чтобы избежать его растрескиванию.

2. Препарат тщательно промыть водой только после охлаждения стекла.

3. Влажный препарат докрасить красителем нейтральрот в течение 2-3 мин.

4. Промыть препарат водой, высушить фильтровальной бумагой и микрокопировать с иммерсионным маслом. После такого способа окрашивания споры окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а вегетативные клетки в розовый.

5. Под микроскопом в поле зрения найти отдельные споры, вегетативные клетки и споры в середине вегетативных клеток. Сделать схематический рисунок.

8. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы.

Микробиологический словарь: свободноживущие азотфиксаторы, симбиотические азотфиксаторы, ассоциативные азотфиксаторы.

Биологическая фиксация азота – это процесс связывания молекулярного азота воздуха азотфиксирующими организмами и переводение его в форму, доступную для других организмов, в первую очередь для растений. Фиксация азота происходит с помощью ферментативного комплекса – нитрогеназы, который катализирует восстановление N_2 до NH_3 , при этом источником энергии служат молекулы АТФ. Азотфиксирующие микроорганизмы – систематически гетерогенная группа, в которую входят:

- свободноживущие азотфиксаторы: спорообразующие палочки (*Bacillus*, *Clostridium*), метилотрофные бактерии (*Methylobacter*, *Methylococcus*), тионовые и серобактерии (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*), некоторые зеленые и пурпурные бактерии, большинство цианобактерий, археи (*Methanobolbus*, *Methanosarcina*);

- симбиотические (клубеньковые) бактерии группы *Rhizobium*;

- ассоциативные азотфиксаторы – виды родов *Azospirillum*, *Beijerinckia*, которые живут на поверхности корней высших растений.

8.1. Изучение свободноживущих и ассоциативных азотфиксаторов.

Представители группы свободноживущих азотфиксаторов (азотобактерии) – грамотрицательные, хемоорганогетеротрофные, аэробные бактерии. Наиболее распространенными являются виды родов *Azotobacter* и *Azomonas*. Они имеют клетки палочковидной или овальной формы, в основном подвижные – перитрихи и монотрихи. Некоторые представители азотобактерий синтезируют полисахаридную капсулу, поэтому на твердых питательных средах формируют слизистые колонии. Бактерии рода *Azotobacter* могут образовывать цисты (покоящиеся формы) – структуры, которые образуются вследствие появления дополнительных слизистых слоев вокруг клетки, и

таким образом клетки становятся устойчивыми к высушиванию. Встречаются азотобактерии в основном в нейтральных и щелочных почвах, а также в водоемах.

Среди ассоциативных азотфиксаторов наиболее распространенными являются представители рода *Azospirillum* – утолщенные вибрионы или короткие палочки, часто с заостренными концами, в основном подвижные, благодаря подвижному жгутику, грамотрицательные или грамвариабельные, аэробы.

Изучение азотобактерий.

Ход работы:

1. На хорошо обезжиренное предметное стекло нанести небольшую каплю красителя метиленового синего.
2. В каплю красителя внести небольшое количество бактериальной культуры и тщательно перемешать с помощью бактериальной петли.
3. С помощью покровного стекла жидкость распределить по поверхности предметного стекла и сделать тонкий мазок.
4. Препарат высушить при комнатной температуре и микроскопировать с иммерсионной системой.
5. Под микроскопом на темном поле найти слабоокрашенные кокки или диплококки. Неокрашенный слой вокруг клетки – капсула, которая задерживает краситель. Сделать схематический рисунок.

Изучение азоспирилл.

Ход работы:

1. Приготовить мазок *Azospirillum* sp., высушить при комнатной температуре и зафиксировать в пламени горелки.
2. Мазок окрасить фуксином в течение 2-3 мин.
3. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсией.
4. Найти в поле зрения толстые изогнутые клетки розового или красного цвета.
5. Сделать схематический рисунок

8.2. Изучение симбиотических азотфиксаторов.

Клубеньковые бактерии – представители рода *Rhizobium*, способны проникать в клетки корня высших растений и вызывать их разрастание, при этом образуются клубеньки, внутри которых и развиваются бактерии. В результате симбиотических взаимоотношений бактерии получают питательные вещества, а растение азот в усвояемой форме (в виде аминокислот). Ризобии имеют форму палочек, подвижные, неспорообразующие, облигатные аэробы, не способные фиксировать азот вне клубеньков.

Клубеньки образуются из клеток корня, питательные вещества доставляются бактериям по транспортной системе, которая образуется сосудами растений, а в середине клубенька развиваются клетки ризобиев, при этом они изменяют форму клетки – становятся Y-, V-подобными, преобразуясь в бактериоиды. Клубеньковые бактерии исключительно видоспецифичны, т.е. способны образовывать симбиотические связи только с определенным видом растений.

Ход работы:

1. Приготовить мазок культуры клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium* sp., высушить при комнатной температуре и зафиксировать в пламени горелки.
2. Мазок окрасить метиленовым синим в течение 2-3 мин.
3. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсией.
4. Найти в поле зрения тонкие палочковидные клетки сине-голубого цвета.
5. Сделать схематический рисунок.

9. Аммонификация и аммонифицирующие микроорганизмы.

10. Нитрификация и нитрифицирующие микроорганизмы.

11. Целлюлозоразрушающие микроорганизмы.

Микробиологический словарь: целлюлозоразрушающие микроорганизмы, аэробное и анаэробное разложение целлюлозы, целлюлосомы, среда Гетчинсона.

Целлюлоза является энергетическим и конструктивным материалом для разных групп микроорганизмов – бактерий (кlostридии, миксобактерии), актинобактерий, микроскопических грибов. Все эти микроорганизмы способны к ферментативному расщеплению целлюлозы. Этот процесс может протекать как в аэробных так и в анаэробных условиях. В присутствии кислорода целлюлоза окисляется до CO_2 и H_2O , в бескислородной среде до CO_2 и CH_4 . Расщепление целлюлозы катализирует комплекс ферментов, которые могут выделяться в окружающую среду (экзоферменты) или находится в середине целлюлосом (эндоферменты). Целлюлосомы – специальные образования на поверхности бактериальной клетки, которые состоят из полипептидных субъединиц и углеводородных фибрилл.

11.1. Получение накопительной культуры аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

В аэробных условиях разрушать целлюлозу способны как эукариоты (микроскопические грибы *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* и другие) и прокариоты: актинобактерии родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и бактерии – *Cytophaga* (длинные палочки, слегка изогнутые, с заостренными концами), *Cellvibrio* (подвижные короткие, слегка изогнутые палочки), *Cellfalcicula* (короткие толстые палочки с заостренными концами) и др.

Ход работы

1. В стерильные конические колбы объемом 100-200 мл налить 50-100 мл стерильной среды Гетчинсона.
2. В колбу внести 0,5-1 г почвы и на кончике скальпеля – мел.
3. Из круглого листка фильтровальной бумаги сделать складчатый фильтр и опустить его на дно колбы широкой стороной вниз.
4. Колбу закрыть ватно-марлевой пробкой и поставить в термостат при температуре 25-26⁰С на 14 суток.

11.2. Изучение целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

Ход работы

1. С помощью бактериальной петли взять небольшой кусочек слизи или кусочек полуразрушенной бумаги и размазать по предметному стеклу без добавления ВОДЫ.
2. Приготовленный мазок высушить и зафиксировать в пламене горелки.
3. Зафиксированный мазок окрасить красителем фуксин в течение 3-4 мин.
4. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсионным маслом.
5. В поле зрения целлюлозоразрушающие микроорганизмы разной морфологии. Сделать схематичный рисунок.

12. Молочнокислые бактерии.

Микробиологический словарь: молочнокислые бактерии, молочнокислое брожение, гомоферментативные бактерии, гетероферментативные бактерии.

Молочнокислые бактерии – физиологическая группа хемоорганогетеротрофных, неспорообразующих, неподвижных, факультативно анаэробных микроорганизмов, вызывающих молочнокислое брожение. Встречаются в молоке и кисломолочных продуктах, в соленьях, маринадах, в почве, в филлосфере и ризосфере растений, в кишечные позвоночных. В результате сбраживания сахаров (глюкоза, фруктоза, манноза, сахароза, лактоза, мальтоза и др.) образуют молочную кислоту (гомоферментативное брожение) или молочную, уксусную кислоты, этанол, CO₂ (гетероферментативное брожение).

12.1. Изучение молочнокислых бактерий.

Ход работы:

1. На предметное стекло нанести каплю кисломолочного продукта или росола, добавить каплю дистиллированной воды и с помощью бактериальной перли и приготовить мазок,
2. Мазок высушить над пламенем горелки и зафиксировать смесью Никифорова – несколько раз смесь нанести на мазок и слить,
3. На фиксированный мазок нанести несколько капель метиленовой сини на 3-5 мин,
4. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсионным маслом,
5. Найти в поле зрения цепочки кокков и палочек. Сделать схематический рисунок.

13. Уксуснокислые бактерии.

Микробиологический словарь: уксусные бактерии, уксусная кислота, неполное окисление, недоокислители, перекислители.

К уксуснокислым бактериям относятся два рода хемоорганогетеротрофных, неспорообразующих, в большинстве подвижных, облигатно аэробных микроорганизмов, которые получают энергию в результате окисления первичных спиртов до карбоновых кислот (этанол – до уксусной кислоты, вторичные спирты – до кетонов). Представители уксуснокислых бактерий – роды *Glucanobacter* (способны окислять этиловый спирт до

уксусной кислоты, недоокислители) и *Acetobacter* (быстро окисляют этанол до уксусной кислоты, а потом кислоту медленно окисляют дальше с выделением CO₂, переоокислители). В природе встречаются на поверхности спелых ягод или в воздухе.

13.1. Изучение уксуснокислых бактерий.

Ход работы

1. На предметное стекло нанести каплю воды, в нее с помощью бактериальной петли перенести кусочек пленки с накопительной культуры и сделать мазок,
2. Добавить раствор Люголя, накрыть покровным стеклом и через 10 минут микроскопировать с иммерсионным маслом,
3. Найти в поле зрения окрашенные в желтый или синий цвет одиночные палочки и цепочки. Сделать схематический рисунок.

14. Спиртовое брожение.

15. Микрофлора тела человека.

Микробиологический словарь: нормальная микрофлора человека, автохтонная и аллохтонная микрофлора, биопленки.

На поверхности кожи и слизистых оболочек, во внутренних органах человека обитает около 10¹³ клеток микроорганизмов. Популяции этих организмов составляют нормальную микрофлору (аутофлору) человеческого организма. Различают автохтонную (постоянную) микрофлору и аллохтонную (транзиторную, случайную). Микроорганизмы благодаря взаимодействию поверхностных структур с протеинами мембран макроорганизма, образуют биопленки и таким образом выполняют защитную функцию. На поверхности кожи человека имеется большое количество аллохтонных микроорганизмов потому что она является открытой экосистемой. В состав постоянной микрофлоры кожи человека входят микрококки, сарцины, аэробные и анаэробные дифтероиды, коринебактерии, брeвибактерии. Кроме того на поверхности кожи можно обнаружить аэробные спорообразующие палочки (*p. Acinetobacter*), которые находятся в воздухе, почве, воде. Наибольшее количество микроорганизмов обнаруживается вокруг сальных и потовых желез. Количество микроорганизмов зависит от возраста человека, пола, состояния иммунной системы.

15.1. Изучение микрофлоры кожи человека.

Микрофлору кожи человека можно изучать с помощью метода смывов и метода отпечатков. При использовании первого метода стерильной ватой, смоченной физиологическим раствором, протирают поверхность кожи, ногтей, затем вату переносят в пробирку с полужидкой питательной средой, тщательно перемешивают, и через 60 минут небольшое количество суспензии переносят на твердую питательную среду в чашки Петри. Чашки выдерживают в течение 24 часов в термостате при температуре 36°C, а потом – еще 2-3 суток при комнатной температуре. Метод отпечатков является экспресс-методом, он очень прост и не требует особых навыков микробиологических исследований.

Ход работы:

1. На водяной бане расплавить твердую питательную среду МПА.

2. С соблюдением правил стерильности приблизительно 10 мл охлажденного до температуры 40-45°C МПА внести в стерильную чашку Петри и оставить до полного застывания.

3. С соблюдением стерильности слегка прикоснутся пальцем к поверхности агаровой пластинки в чашке Петри.

4. Засеянные таким образом чашки Петри поставить в термостат при температуре 35-36°C.

5. На следующем лабораторном занятии изучить культурально-морфологические признаки колоний микроорганизмов, которые выросли на МПА в чашках Петри.

15.2. Изучение культурально-морфологических признаков бактерий.

Морфологические признаки. К ним относятся форма и размеры бактериальных клеток, присутствие или отсутствие капсул, слизи, жгутиков, окраска по Граму, способность к спорообразованию.

Культуральные признаки. К ним относятся способность микроорганизмов расти на той или иной питательной среде, характеристика колоний, которые выросли на плотной питательной среде (например МПА). Изучение проводят с использованием микроскопа МБС-9.

Форма колоний – округлая, ризоидная, амебоидная, нитчатая, складчатая, концентрическая, неправильная.

Размер колонии – измеряется линейкой, выражается в мм. Колония диаметром 10 мм и больше – большая, 1-10 мм – средняя, если размер колонии около 1 мм, ее считают точечной. Размер очень маленьких колоний определяют с помощью окуляр-микрометра.

Цвет колонии и цвет окружающего агара – прозрачный, бесцветный, окрашенный. Окраску колонии определяют с помощью шкалы цветов, если микроорганизмы выделяют пигмент в среду, определяют и его цвет. Иногда микроорганизмы имеют окрашенный в другой цвет реверзум (обратная сторона колонии).

Поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая.

Профиль колонии – плоский, выпуклый, кратеровидный, врастающий в агар, бугристый, каплевидный, конусовидный.

Край колонии – гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, неправильный, ворсинистый, нитчатый, игольчатый.

Структура колонии – однородная, мелкозернистая, крупнозернистая, волокнистая (определяется с помощью бактериальной петли).

Ход работы.

1. С помощью микроскопа МБС-9 определить культуральные признаки колонии микроорганизма.

2. С помощью шкалы цветов определить цвет колонии.

3. Сделать мазок и окрасить по Граму и методом Пешкова.

4. Результаты определения культуральных признаков колоний микроорганизмов и их морфологию записать в лабораторный журнал.

16. Микрофлора воздуха.

Темы занятий для самостоятельной подготовки.

„История развития микробиологии“

1. Жизнь и деятельность Антония Ван Левенгука.
2. Основатель физиологического направления в микробиологии – Луи Пастер.
3. Вклад в развитие микробиологии Эдуарда Дженера и Александра Флеминга.
4. Исследования Роберта Коха в области медицинской микробиологии.
5. Работы С.М. Виноградского и Мартина Бейеринка в области почвенной микробиологии.
6. Вклад в развитие микробиологии русских микробиологов –И.И. Мечникова, В.М. Шапошникова, Г.А. Надсона.
7. Капиллярные методы изучения микроорганизмов – работы М.Г. Холодного, Б.В. Перфильева, Д.Р. Габе.
8. Микробиология в XX-XXI столетиях – основные открытия и направления исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Билай В.И. Победители невидимых. Из истории микробиологии. – М.: Учпедгиз, 1959.
- Биологи. Библиографический справочник. – К.: Наук. думка, 1984.
- Блохина И.Н., Ливанова Г.Ф. Геносистематика бактерий. – М.: Наука, 1976.
- Вопросы эволюции бактерий. – Пушино, 1984.
- Выдающиеся советские генетики. – М.: Наука, 1980.
- Г. де Крюи Охотники за микробами. – М.: Наука, 1987.
- Гарвей, Дженнер, Кювье, Пирогов, Вирхов: Биографические повествования. – Челябинск: Урал LTD, 1998.
- Заварзин Г.А. Фенотипическая систематика бактерий. – М.: Наука, 1974.
- Захарова Н.Г., Багаева Т.В. Систематика и функциональная морфология микроорганизмов. – Казань, 1989.
- Имшенецкий А.А. Луи Пастер. Жизнь и творчество. – М.: Изд-во АН СССР, 1961.
- История биологии с начала XX века и до наших дней. – М.: Наука, 1975.
- Моруа А. Жизнь Александра Флеминга. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1961.
- Яновская М.И. Роберт Кох (1843-1910). – М.: Молодая гвардия, 1962.

„Место микроорганизмов в системе живых существ“

1. Историческая сводка про первые попытки классификации микроорганизмов.
2. Основные принципы классификации микроорганизмов.
3. Нумерическая систематика бактерий М. Адансона.
4. Филогенетическая систематика бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

- Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. Геносистематика Бактерий. – М.: Наука, 1976.

- Вопросы эволюции бактерий. – Сборник статей. – Пущино, 1984.
- Заварзин Г.А. Фенотипическая систематика бактерий. – М.: Наука, 1974.
- Захарова Н.Г., Багаева Т.В. Систематика и функциональная морфология микроорганизмов. – Казань, 1989.
- Протисты /под ред. А.Ф. Алимова. – М.: Наука, 2000.

“Жизненные циклы бактерий, особенности развития популяций микроорганизмов”

1. Спорообразование у прокариот.
2. Жизненные циклы разных групп бактерий и актиномицетов.
3. Фазы развития бактериальной популяции.
4. Особенности развития популяции гифальных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Иванов В.Н., Угодчиков Г.А. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. – К.: Наук. думка, 1984.
- Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. – М.: Наука, 1977.
- Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов. – М.: Наука, 1991.
- Печуркин Н.С. Популяционная микробиология. – Новосибирск: Наука, 1978.
- Рост микроорганизмов. Сборник статей. – Пущино, 1984.

“Особенности взаимоотношений микроорганизмов в природе”

1. Комменсализм у микроорганизмов.
2. Синтрофизм у микроорганизмов.
3. Паразитизм и хищничество у микроорганизмов.
4. Хищничество у микроорганизмов.
5. Антагонистические взаимоотношения между разными группами микроорганизмов.
6. Использование микроорганизмов в производстве бактериальных удобрений.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреюк Е.И., Валагурова Е.В. Основы экологии почвенных микроорганизмов. – К.: Наук. думка, 1992.
- Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989.
- Громов Б.В. Экология бактерий. – М.: Высшая школа, 1984.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1979.
- Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. – М.: Изд-во МГУ, 1985.
- Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. – М.: Мир, 1979 (Том 3).

„Участие микроорганизмов в круговороте веществ в природе”

1. Роль микроорганизмов в круговороте азота.
2. Роль микроорганизмов в круговороте серы.
3. Роль микроорганизмов в круговороте углерода.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреюк Е.И., Билай В.И., Коваль Э.З., Козлова И.А. Микробная коррозия и ее возбудители. – К.: Наук. думка, 1980.
- Андреюк Е.И., Валагурова Е.В. Основы экологии почвенных микроорганизмов. – К.: Наук. думка, 1992. – 221 с.
- Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 222 с.
- Вавилин В.А., Васильев В.Б., Рытов С.В. Моделирование деструкции органического вещества сообществом микроорганизмов // М.: Наука, 1993. – 179 с.
- Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М.: Наука, 1974.
- Кондратьева Е.Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. – М.: МГУ, 1983. – 172 с.
- Никитин Г.А. Биохимические основы микробиологических производств. – К.: Вища школа, 1994. – 230 с.

ТРЕБОВАНИЯ К НАПИСАНИЮ КУРСОВОЙ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Курсовая работа объемом 10-15 страниц формата А4 должна быть написана от руки.

Титульная страница курсовой работы оформляется по общепринятым правилам.

Курсовая работа должна включать следующие разделы: вступление, основная часть (может быть разделена на разделы и подразделы), заключение (или выводы). Необходимо написать содержание и список использованной литературы.

В тексте курсовой работы в квадратных скобках необходимо указать ссылку на порядковый номер источника литературы, без указания процитированных страниц.

При написании курсовой работы допускается использование Интернет-ресурсов, при условии правильного оформления ссылок, но они не должны быть единственными источниками информации.