

23.03.23.

05 група

Методи мікробіологічних досліджень

Тема: Приготування бактеріальних препаратів

Препарат-мазок для зафарбовування готується у декілька етапів:

1. Виготовлення препарату.
2. Висушування мазка.
3. Фіксація мазка.
4. Зафарбовування мазка.

Для виготовлення препарату використовують предметні скельця – тонкі скляні пластинки розміром 76×26 мм із відшліфованими боками. Під час мікроскопування використовують покривні скельця товщиною 0,15–0,17 мм і розміром 18×18, 20×20, 18×24 мм.

Скельця повинні бути чистими, знежиреними і завчасно підготовленими. Якщо скельце добре знежирене, то крапля води рівномірно розтікається на його поверхні, не утворюючи випуклих ділянок.

Методи очищення скелець

1. Якщо скельце було у вжитку, то його витримують у концентрованій H_2SO_4 протягом 1–2 год, потім промивають водою, кип'ятять у 2%-му розчині соди (Na_2CO_3) або мильній воді, ретельно ополіскують водою і протирають м'якою чистою тканин
2. Предметні і покривні скельця обробляють гарячим (80–90°C) 10%-ним розчином NaOH або КОН протягом 5–10 хв, потім ополіскують водою, переносять в 96%-ний етанол і зберігають у ньому до використання.
3. Нові скельця промивають у воді, потім у суміші спирту з ефіром (1:1). Оброблені предметні скельця зберігають у банці з притертим корком у сухому вигляді, в спирті або спиртово-ефірній суміші.
4. Покривні скельця обробляють спиртом, витирають чистою тканиною і зберігають у коробці або бюксі.

Чисті скельця беруть лише пінцетом, оскільки пальці залишають на них жирні плями. Якщо скельця зберігаються в розчиннику, їх перед використанням висушують фільтрувальним папером і трішки обпалюють на полум'ї горілки чи спиртівки.

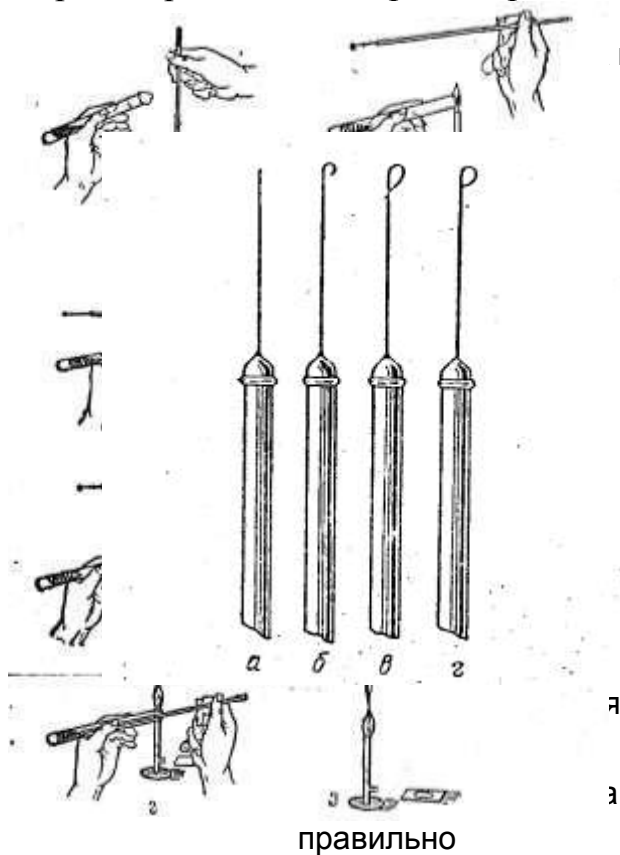
Під час тривалого використання скельця втрачають прозорість і стають

непридатними.

Виготовлення препарату мазка

Препарат-мазок готують за допомогою бактеріологічних петель або пастерівських піпеток (рис. 7,8,9). Бактеріологічну петлю готують із платинового або ніхромового дроту довжиною 5–7 см і товщиною 0,5 мм із привареною до нього скляною ручкою або вставляють у металеву ручку – петлетримач. Такий дріт легко стерилізується на полум'ї і швидко охолоджується.

Для виготовлення препарату-мазка культуру мікроба, яка досліджується, обережно розподіляють рівномірним тонким шаром на предметному скельці.



приготування мазка

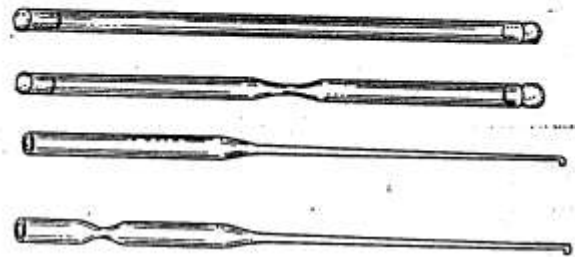


Рис. 9. Пастерівська піпетка на різних стадіях виготовлення

Метод А. Виготовлення мазка із культур, які вирости на щільному середовищі

На чисте предметне скельце стерильною піпеткою або бактеріологічною петлею наносять краплю стерильної води або фізіологічного розчину. Пробірку з культурою, з якої необхідно приготувати мазок, у нахиленому положенні розміщують на вказівному і середньому пальцях лівої руки і зверху притискають великим пальцем так, щоб добре було видно всю поверхню поживного середовища із мікроорганізмами, які вирости на ній.

Перш ніж взяти матеріал із культури, необхідно прожарити бактеріологічну петлю в полум'ї горілки до почервоніння. Петля при цьому повинна перебувати у вертикальному положенні, так, щоб полум'я охоплювало не тільки всю петлю, але і частину голкотримача. Під час роботи петлю або піпетку тримають у правій руці як олівець або ручку під час писання.

Затиснувши корок між мізинцем і долонею правої руки (в ній же тримають підготовлену петлю) виймають його із пробірки і тримають кінцем вниз, не допускаючи зіткнення з ручкою тієї частини корка, яка була в пробірці. Відкритий кінець пробірки обпалюють на полум'ї і відхиляють трохи до себе; після цього вводять в пробірку петлю (ще раз проведену через полум'я), охолоджують дотиком до стінки пробірки і набирають трішки матеріалу, лише дотикаючись до культури (не дряпати середовище петлею!) (рис.7).

Після відбирання проби пробірку відразу затикають ватним корком- тампоном, але перед цим обов'язково відкритий кінець пробірки і кінець корка обпалюють на полум'ї горілки.

Матеріал, який відібрали з культури, емульгують у краплині води, яка заздалегідь поміщена на предметне скло і рівномірно, тонким шаром розподіляють петлею на поверхні скельця (розмір приблизний 1,5×2 см).

Метод Б. Виготовлення культур, які вирости в рідкому поживному середовищі

Стерильну петлю опускають в рідину, захоплюють краплину і розтирають її на предметному скельці. На зворотному боці обводять олівцем для написання по склі те місце, де міститься мазок. Це полегшує пошук мазка під час мікроскопування. Після нанесення мазка петлю прожарюють і кладуть на місце.

Завдання

1. Ознайомитися із барвниками, які найчастіше використовуються в мікробіологічній практиці.
2. Приготувати будь-яку фарбу, визначену викладачем, і проглянути її під мікроскопом для перевірки її якості.
3. Приготувати мазок із зубного нальоту і зафарбувати простим методом.
4. Розглянути виготовлені і фарбовані мазки під мікроскопом.

Хід виконання роботи

Приготування препарату-мазка із зубного нальоту

На предметне скло наносять бактеріологічною петлею краплину стерильного фізіологічного розчину або води, потім обережно знімають зубний наліт сірником (без сірчаної голівки), розтирають у краплині і тонким шаром розподіляють на поверхні скла. Мазок підсушують на повітрі, фіксують і зафарбовують.

Висушування препарату виконують на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не рекомендується, оскільки при цьому відбувається грубе згортання білків у результаті швидкої втрати вологості; при цьому клітини втрачають природну форму. Під час висушування препарат накривають скляним ковпаком, захищаючи від мух і попадання пилу.

Фіксація висушеного препарату потрібна для забезпечення кращого присипання мікробних клітин до скла, а також для того, щоб убити мікроорганізми, оскільки мертві клітини легше зафарбовуються, ніж живі. Фіксацію препарату виконують над полум'ям спиртівки. Для цього предметне скло беруть за куточки великим і вказівним пальцями і, тримаючи мазком догори, повільно проводять скельце через полум'я не менш, ніж 3 рази. При цьому в сумі мазок повинен перебувати в полум'ї не більше 2 с. Тривала фіксація може змінити структуру мікробних клітин та їх форму. Якщо ж мазок недостатньо прогрівали і погано зафіксували, він змивається зі скла при подальшій обробці.

Для фіксації можна використовувати також різні хімічні сполуки. До них належать:

Абсолютний етиловий спирт – в ньому мазки витримують від 15 хв до 30 хв.

Спиртово-ефірна суміш (етанол:ефір, 1:1) – в ній мазки витримують 2–5 хв.

Метиленовий або аміловий спирт – мазки в цих спиртах витримують протягом 5 хв.

Фіксація здійснюється шляхом занурювання мазка в кювету з однією із вищесказаних речовин або наливанням цих речовин на мазок.

Д/З Опрацювати тему