

22.03.23.

05 група

Методи мікробіологічних досліджень

Тема: Барвники і барвні розчини.

Мета роботи: ознайомитись із барвниками і методами приготування їх розчинів.

Обладнання і матеріали: набір сухих барвників. Набір готових розчинів барвників:

- а) основний і кислий фуксин;
- б) генціанвіолет;
- в) метиленовий синій;
- г) сафранін;
- д) малахітова і діамантова зелень.

Предметні скельця, розчин водного фуксину (фуксин Пфейффера), бактеріологічні петлі, фільтрувальний папір, спиртові або газові горілки, мікроскопи.

Методичні вказівки

Для роботи із мікроорганізмами потрібне певне обладнання. На робочому лабораторному столі повинні бути:

1. Спиртівка або газова горілка.
2. Бактеріологічна петля.
3. Предметні скельця.
4. Покривні скельця.
5. Набір барвників.
6. Мікроскоп.
7. Серветка.
8. Кедрове масло.
9. Пінцет.
10. Кювета з містком (або кристалізатор з містком).
11. Ємність з водою.
12. Пісочний годинник.

13. Олівець для скла (склограф).

14. Фільтрувальний папір.

Для вивчення форми мікробної клітини і деяких її структур препарат (мазок) із матеріалу, що містить мікроб, якого вивчають на даний момент, як правило, зафарбовують.

Більшість мікробів досить швидко і добре зафарбовуються розчинами анілінових барвників. За хімічними властивостями барвники поділяють на основні і кислі. Хромофором (тобто іоном, який надає забарвлення) основних барвників є катіон, а кислих – аніон.

До основних барвників належать:

1. Червоні:

- нейтральний червоний;
- фуксин основний;
- сафранін;
- тіонін;
- піронін;
- гематоксилін.

2. Сині:

- метиленовий синій.

3. Фіолетові:

- кристалічний фіолетовий;
- метиленовий фіолетовий.

4. Зелені:

- малахітовий зелений;
- метиленовий зелений.

Основні барвники, як правило, легко зв'язуються із ядерними (кислими) компонентами клітин.

До кислих барвників належать:

1. Червоні і рожеві:

- фуксин кислий;
- еозин;
- еритрозин.

2. Жовті:

- пікринова кислота;
- конго;
- флуоресцеїн.

3. Чорні:

- нігрозин.

Кислі барвники інтенсивніше забарвлюють основні компоненти клітин.

Частина 1. Приготування робочих розчинів барвників

Перш ніж приготувати робочі розчини барвників, які призначені для забарвлення мікробів, часто заздалегідь готують насичені спиртові розчини із сухих барвників. Для цього фарбу заливають 96%-ним спиртом у співвідношенні 1:10. При такому співвідношенні спирт насичується барвником

(та частина барвника, яка не розчинилась, залишається в осаді). З метою економії рекомендують на 100 мл етанолу брати такі кількості барвників: метиленового синього – 7,0 г; генціанвіолету – 4,8 г; основного фуксину – 8,1 г. Для кращого насичення спиртові розчини поміщають в термостат і витримують до повного розчинення барвників. Із насичених спиртових розчинів в міру необхідності готують водні робочі розчини.

Карболовий фуксин (фуксин Циля)

а) беруть 100 мл насиченого спиртового розчину основного фуксину і 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Другий розчин, постійно помішуючи, поступово доливають до першого (**НЕ НАВПАКИ!!**). Після змішування готовий розчин фільтрують через паперовий фільтр і зберігають в склянці із темного скла і добре закупореній;

б) 1 г основного кристалічного фуксину, 5 г кристалічного фенолу, декілька крапель гліцерину, 10 мл 96% етанолу, 100 мл дистильованої води.

Фуксин і фенол ретельно розтирають в ступці, додаючи по краплях гліцерин. Після цього, постійно помішуючи, по краплині додають етанол, поступово збільшуючи порції етанолу; після додавання цієї порції етанолу починають доливати воду і перемішують. Розчин в ступці, який отримали, витримують 48 год у термостаті при 37°C до повного розчинення фуксину. Лише після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр.

Ця фарба дуже стійка і може зберігатися тривалий час. Фарбу використовують для роботи із мікроорганізмами, які важко зафарбовуються (спорові форми, кислотостійкі бактерії).

Фуксин Пфейффера

Готують із карболового фуксину Циля методом розведення дистильованою водою у співвідношенні 1:10.

Розчин нестійкий, під час зберігання знебарвлюється. Саме з цієї причини розчини такого типу готують безпосередньо перед використанням у невеликих кількостях.

Метиленовий синій

До 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього додають 100 мл дистильованої води та 1 мл 1%-го водного розчину КОН або NaOH.

Розчин цього барвника може зберігатися довго; після певної

витримки у часі цей розчин фарбує навіть більш ефективно, ніж свіжо виготовлений.

Карболовий генціанвіолет

До 10 мл насиченого спиртового розчину барвника додають 100 мл 5%-го водного розчину фенолу. Розчин витримують протягом 2–3 днів у термостаті.

Розчин Люголя

Цей розчин не є справжнім барвником. Основна складова його частина – кристалічний йод. Розчин використовується для забарвлення клітин за Грамом.

Для приготування розчину 1 г I_2 і 2 г KI розчиняють у 300 мл дистильованої води. Йод погано розчиняється у воді, тому спочатку необхідно розчинити йодистий калій у 5–10 мл води, потім додати кристалічний йод, розчинити його в розчині йодистого калію і лише після цього долити ту дистильовану воду, що залишилась, тобто довести об'єм до 300 мл. Отриманий розчин фільтрують і зберігають у темних (коричнєве скло) пляшечках у прохолодному місці.

Перевірка якості готових фарб

Розчини фарб, як правило, фільтрують через паперові фільтри. Щоб переконатися, що після фільтрації в розчині немає нерозчинених частинок фарби, декілька краплин цього розчину наливають на предметне скельце. Через 2–3 хв фарбу змивають водою, скло просушують фільтрувальним папером і проглядають під імерсійним об'єктивом. При наявності нерозчинених частинок, які виявляються у вигляді окремих грудочок, необхідно профільтрувати розчин фарби знову і повторити мікроскопування цього розчину. Якщо у фарбі немає нерозчинених частинок, то предметне скло буде слабо і рівномірно забарвлене барвником.