17.09.24.

25 група

Методи мікробіологічних досліджень.

Т е м а

Дослідження бактерій у фарбованому стані. Бактеріологічні фарби.

Прості методи фарбування бактерій. Складні методи фарбування бактерій: забарвлення по методу Грама.

1. ***Мета заняття.*** Ознайомити студентів з основними бактеріологічними фарбами, технікою їх приготування і методом простого фарбування бактеріальних препаратів. Ознайомити студентів з складними методами фарбування, за допомогою яких диференціюють грампозитивні, грамнегативні бактерії.

Основні фарби. Червоні (нейтральний червоний, піронін, сафранін, основний фуксин); фіолетові (генціан фіолетовий, кристалічний фіолетовий, гематоксилін, тионін); сині (вікторія, метіленовий синій); зелені (малахітовий зелений, метиленовий зелений, янус зелений); коричневі (везувін, хризоїдин); чорні (індулін).

Кислі фарби. Рожеві і червоні (кислий фуксин, еозин, еритрозін, гропеолін); жовті (аурантіл, конго, пікринова кислота); чорні (нігрозин).

Спиртно-водні розчини фарб. Це розчини тривалого зберігання їх готують з сухих фарб. Розчини спочатку витримують в термостаті для кращого розчинення речовин, потім фільтрують через паперові фільтри, щоб позбавитися від мікрочасток.

У мікробіології найчастіше застосовують розчини наступних фарб:

Карболовий фуксин Циля. Розчин А: основний фуксин 0,3 г, 96 %-й етанол - 10мл. Розчин Б: фенол - 5г, вода дистильована 95мл. Розчини А і Б змішують.

Фуксин Пфейффера - це фуксин Циля, розведений водою в співвідношенні 1:10 (через нестійкість використовують тільки протягом робочого дня).

Карболовий кристалічний фіолетовий (генціанвіолет). Розчин А: кристалічний фіолетовий - 0,4 г, 96%-й етанол - 10мл; розчин Б: фенол - 1г, вода дистилює - 100мл. Розчини А і Б змішують.

Лужний метиленовий синій Льофлера. Розчин А: метиленовий синій - 0,3 г, 96%-й етанол - 30мл. Розчин Б: 0,01%-й розчин гідроксиду калія - 100мл. Розчини А і Б змішують.

Водні розчини фарб. Розчини цих фарб нестійкі, їх готують безпосередньо перед використанням (ex temporе).

Розчин сафраніну: сафранін - 2г, вода дистильована гаряча (t ~90°С) - 100 мл. Розчин фільтрують через паперовий фільтр.

Розчин малахітового зеленого: малахітовий зелений - 1 г, вода дистильована гаряча - 100 мл. Розчин фільтрують через паперовий фільтр.

Приготування пофарбованих бактеріальних препаратів для світлової мікроскопії. Приготування препаратів включає приготування мазка, його висушування, фіксацію і фарбування. Матеріалом для дослідження служать культури бактерій на щільних або рідких поживних середовищах або нативний матеріал: органи, тканини, запальний ексудат і т.і. Препарати готують на чистих, знежирених предметних скельцях.

Етапи приготування забарвленого препарату бактерій.

1- **й етап.** *Нанесення на предметне скло досліджуваного матеріалу.* Якщо матеріал рідкий і знаходиться в бактеріологічній пробірці, то пробірку беруть в ліву руку, в праву - бактеріологічну петлю, яку пропалюють в полум'ї пальника, мізинцем правої руки захоплюють пробку і над полум'ям пальника витягують її з пробірки, краї пробірки обпалюють. Петлею, не змочуючи петлетримач, беруть матеріал і розподіляють на предметному склі площею розміром 2 х 2 см. Краї пробірки знов обпалюють, закривають її пробкою, обпалюють бактеріологічну петлю і ставлять в штатив. Аналогічним чином готують мазок з агарової культури, обережно захоплюючи петлею бактерійну масу з поверхні живильного середовища. На предметне скло в цьому випадку заздалегідь наносять краплю фізіологічного розчину, в якому петлею суспендують бактеріальну масу. З тваринних тканин готують мазки- відбитки: стерильно вирізають шматочок досліджуваного матеріалу, поверхнею зрізу кілька разів торкаються поверхні предметного скла.

2- **й етап.** *Приготований мазок висушують на повітрі, або проводять* **3-й етап.** *Фіксація мазка.* Мазок фіксують для прикріплення бактеріальних клітин до поверхні скла і їх інактивації. Застосовують хімічний і фізичний способи фіксації. При фізичному способі препарат зворотною стороною скла два-три рази поволі проводять над полум'ям пальника. Надмірне нагрівання викликає зміну форми клітин і її тинкторіальних властивостей. При хімічному способі на предметне скло з мазком наносять одну з наступних рідин: етанол (96 %) - 10 хвилин; ацетон - 5 хвилин; суміш етанолу і ефіру (співвідношення 1:1) - 10...15 хвилин.

4- **й етап.** *Фарбування мазка.* Фіксований препарат фарбують однією із фарб (фуксин Пфейфера, метиленовий синій і тощо) або декількома фарбами при складних методах забарвлення.

5- **йэтап.** *Промивання мазка.* Розчин фарби змивають дистильованою водою, препарат підсушують фільтрувальним папером або на повітрі і мікроскопують.

Процедуру фарбування препарату проводять на «містку» (паралельні скляні трубки) над зливною чашкою.

Прості методи фарбування бактерій. При цьому способі фарбування використовують один фарбник: наприклад, на мазок наносять фуксин

Пфейфера на 2...3 хвилини. У такому препараті можна визначати форму мікробних клітин, їх взаємне розташування.

Фарбування бактерій за методом Грама. При складних методах фарбування бактерій використовують декілька різних фарб, що дозволяє виявити особливості будови і хімічного складу клітини. Метод Грама заснований на відмінностях в будові і хімічному складі клітинної стінки бактерій. Залежно від результатів фарбування всі бактерії підрозділяють на грампозитивних і грамнегативних.

При фарбуванні генціановий фіолетовий у присутності йоду утворює комплекс з компонентами клітинної стінки. У грампозитивних прокаріот клітинна стінка при обробці етанолом утримує комплекс, що утворився, і бактерії забарвлюються у фіолетовий колір; у грамнегативних бактерій етанол вимиває цей комплекс і після додаткового фарбування препарату фуксином клітини набувають червоного кольору.

Етапи фарбування

1- **й етап.** На фіксований мазок крізь фільтрувальний папір наносять розчин генціанвіолета, витримують 2 хвилини, папір видаляють.

2- **й етап.** Препарат, не промиваючи, обробляють розчином Люголя 2 хвилини; розчин зливають.

3- **й етап.** Наносять 96%-й етанол на 30...45 секунд, після чого препарат ретельно промивають водою.

4- **й етап.** Фарбують препарат фуксином Пфейфера 1 хвилину. Знов промивають водою, підсушують фільтрувальним папером і мікроскопують. Мікроскопічна картина: бактерії, забарвлені в темно-фіолетовий колір, відносять до грампозитивних, в червоний - до грамнегативних.

Методи фарбування спор бактерій. Спори - це внутрішньоклітинні утворення бацил та клостридій, які формуються при несприятливих умовах. Вони сферичної або овальної форми, одна мікробна клітина утворює лише одну спору, яка має щільну оболонку і не сприймає барвників. Тому існують спеціальна методи фарбування, основані на прогріванні та дії спеціальних речовин - протрав. Спори фарбують за методами Трухільо, Ауескі тощо. Спори складаються із: спороплазми, мембрани спороплазми, кори, спорових оболонок, єкзоспоріума.

Метод Трухільо

1. Мазок фіксують над полум'ям спиртівки.
2. На мазок наносять водний розчин малахітової зелені і фарбують 2 хвилини при підігріванні до пароутворення, промивають водою.
3. Фарбують розведеним фуксином 1-2 хвилини, промивають водою.
4. Мікроскопують в імерсійній системі.

   Мікрокартина: спори зеленого кольору, вегетативні клітини - червоного.

Виявлення капсул бактерій. Речовина капсули сприймає фарби слабкіше, або забарвлюється в інший колір, чим інші структури клітини, що дозволяє виявляти капсулу.

Метод Міхина

1- **й етап.** Препарат фарбують синькою Льофлера з підігріванням до появи пари і потім витримують ще 5...6 хв.

2-**й етап.** Мазок промивають водою, підсушують, мікроскопують.

Краще використовувати старі розчини фарб, оскільки у них більше виражена здібність до метахромазії (забарвлення речовин, що хімічно відрізняються, в різні кольори). Мікроскопічна картина: капсули -розові, бактерії - темно-сині.

Д/З Опрацювати тему.