

Куб ГАУ

**кафедра микробиологии,
эпизоотологии и
вирусологии**

**Ведущий преподаватель
доктор биологических наук,
профессор**

Нино Нодариевна Гугушвили

Лабораторные занятия по общей микробиологии для факультета ветеринарной медицины

Тема

**Морфология палочковидных и
извитых бактерий. Краски,
используемые в микробиологии.
Приготовление бакпрепаратов.
Методы окраски.**

Задание

1. Изучить палочковидные и извитые формы бактерий по рисункам, таблицам, муляжам, зарисовать.
2. Ознакомиться с основными красками, применяемыми в микробиологии техникой изготовления рабочих растворов.
3. Освоить технику приготовления препаратов из культуры микробов и патологического материала.
4. Приготовить мазок с зубного налета, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Задание УИРС.
5. Провести микробиологический анализ воздуха по методу Коха.

1. Изучить палочковидные и извитые формы бактерий по рисункам, таблицам, муляжам, зарисовать

Палочковидные формы делят на две группы:

неспоровые палочки – бактерии (*Bacterium*) и палочки, образующие споры - бациллы (*Bacillus*).

Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, называют клостридиями (*Clostridium*).

Существуют сапрофиты и патогенные виды бактерий. Например: *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, также к палочковидным бактериям относят коринебактерий и фузобактерии.

Коринебактерии (греч. korine – булава) – прямые или изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах. Встречаются сапрофиты и патогенные для животных и человека. Например: *Corinebacterium pseudotuberculosis*.

Фузобактерии – длинные, толстые с заострёнными концами палочки. Имеются патогенные виды: возбудитель некробактериоза (*Fusobacterium necrophorum*).

Извитые бактерии: к ним относят вибрионы, спириллы и спирохеты. Они обладают спиральной симметрией.

Вибрионы (лат. *vibrio* – извиваюсь). Клетки вибрионов имеют цилиндрическую и изогнутую форму, образуя 1/4-1/2 завитка спирали в виде запятой. Встречаются сапрофиты и патогенные. Например: *Vibrio cholerae* (холерный вибрион)

Спириллы (лат. *spira* – изгиб) – бактерии, имеющие форму спирально извитых палочек с 4-6 витками. Обитают в пресной и морской воде. Преимущественно сапрофиты (*Spirillum volutans*), к патогенным видам относят (*S. minus*) и кампилобактерии (*Campylobacter fetus*).

Спирохеты (греч. speira – изгиб и chaite – длинные волосы) — прокариоты спирально извитой формы. Спирохеты – эластичные длинные спиралевидные клетки, состоящие из осевой нити, цитоплазмы с рибосомами и включениями, нуклеоида и клеточной стенки.

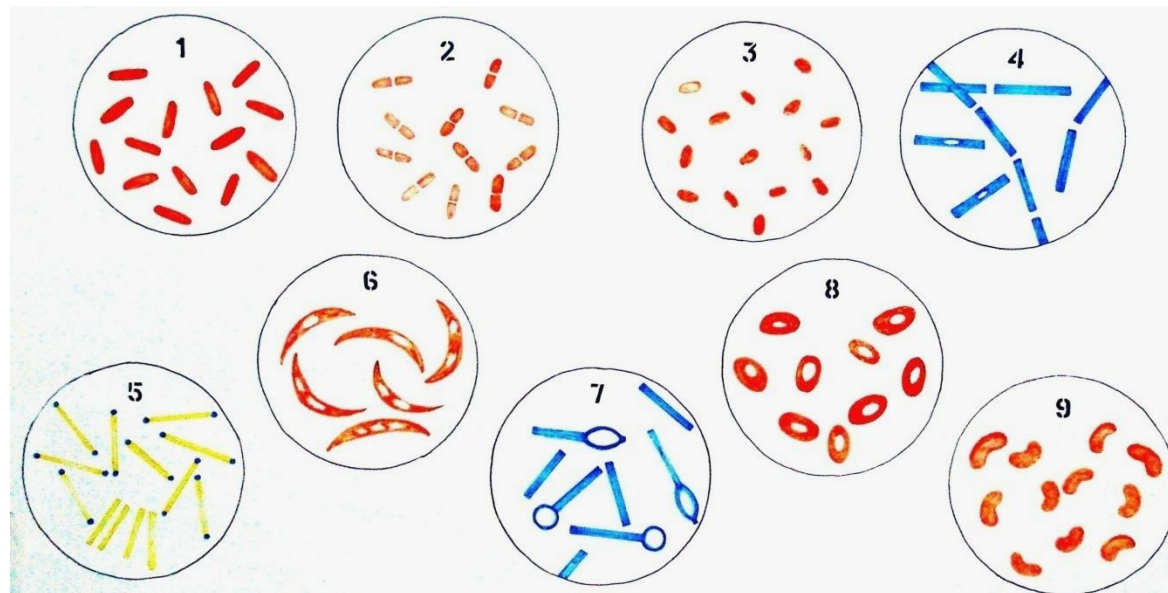
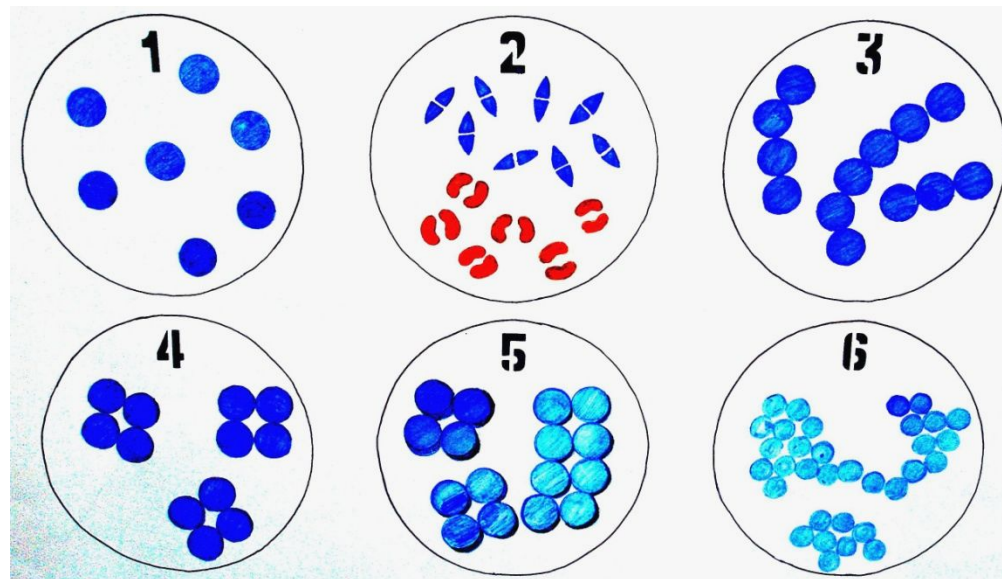
Движение у них осуществляется за счёт сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра.

Формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное.

Размножаются спирохеты поперечным делением. В неблагоприятных условиях спирохеты переходят в цисту – укороченную и свернутую в спираль, окружённую прочной оболочкой клетку.

Кокковидные и палочковидные формы бактерий

- 1 — микрококки;
- 2 — диплококки;
- 3 — стрептококки;
- 4 — тетракокки;
- 5 — сарцины;
- 6 — стафилококки



- 1 — эшерихии;
- 2 — клебсиеллы;
- 3 — бруцеллы;
- 4 — бациллы;
- 5 — коринебактерии;
- 6 — фузиформные бактерии;
- 7 — клостридии;
- 8 — иерсинии;
- 9 - вибрионы

2. Ознакомиться с основными красками, применяемыми в микробиологии техникой изготовления рабочих растворов

Для окрашивания микроорганизмов применяют кислые и основные красители. Первые вступают в реакцию с веществами основной природы, вторые – кислотной природы. Поскольку в белках есть и основные (NH_2^-) и кислотные (COOH) радикалы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми и другими красителями.

Из **основных красителей** наиболее часто в микробиологии применяют: **красные** — нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин; **синие** — виктория, метиленовый синий; **фиолетовые** — генцианфиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый; **зеленые** — янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый; **коричневые** — везувин, хризоидин; **черные** — индулин.

Кислые красители могут быть следующие: **красные** и **розовые** – кислый фуксин, эритрозин; **черные** – нигрозин; **желтые** – конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

Основные красители интенсивнее окрашивают объект более щелочной среде, кислые – в более кислой.

Чтобы различить растворы кислых или основных красителей, в них погружают полоски фильтровальной бумаги. Они несут отрицательный электрический заряд. В случае основного окрашивающего раствора его катионы, обуславливающие окрашивающую способность, фиксируются отрицательным зарядом бумаги по ней вследствие капиллярности будет распространяться только вода (в виде бесцветной полосы). Если раствор содержит кислый краситель, его анионы будут подниматься по бумаге и окрасят ее.

Позитивные красители
окрашивают непосредственно клетки микроорганизмов и другие объекты. Большинство красителей, применяемые в микробиологии относятся к позитивным. Они окрашивают клетки при комнатной температуре в течение 30–60 с.

Негативные красители окрашивают пространство, окружающее клетки микроорганизмов. В результате клетки выглядят силуэтами на окрашенном фоне.

Некоторые микроорганизмы (например, спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь), плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, хорошо прокрашиваются негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не прокрашиваются, и поэтому при окрашивании клеток бацилл позитивными красителями они имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

Различают водные и спиртово-водные растворы красок.

Водные растворы

К ним относятся раствор метиленового синего, раствор малахитовой зелени, раствор сафранина.

Способ приготовления водных растворов.

Берут 1г. Кристаллической краски, добавляют 100мл. Горячей дистиллированной воды, дожидаются полного растворения краски, фильтруют её, остужают, перед употреблением разбавляют дистиллированной водой (1:10).

Спиртово-водные растворы

К ним относят карболовый фуксин (фуксин Циля, фуксин Пфейффера), щелочная синьку Лёффлера и др.

Приготовление спиртово-водных растворов

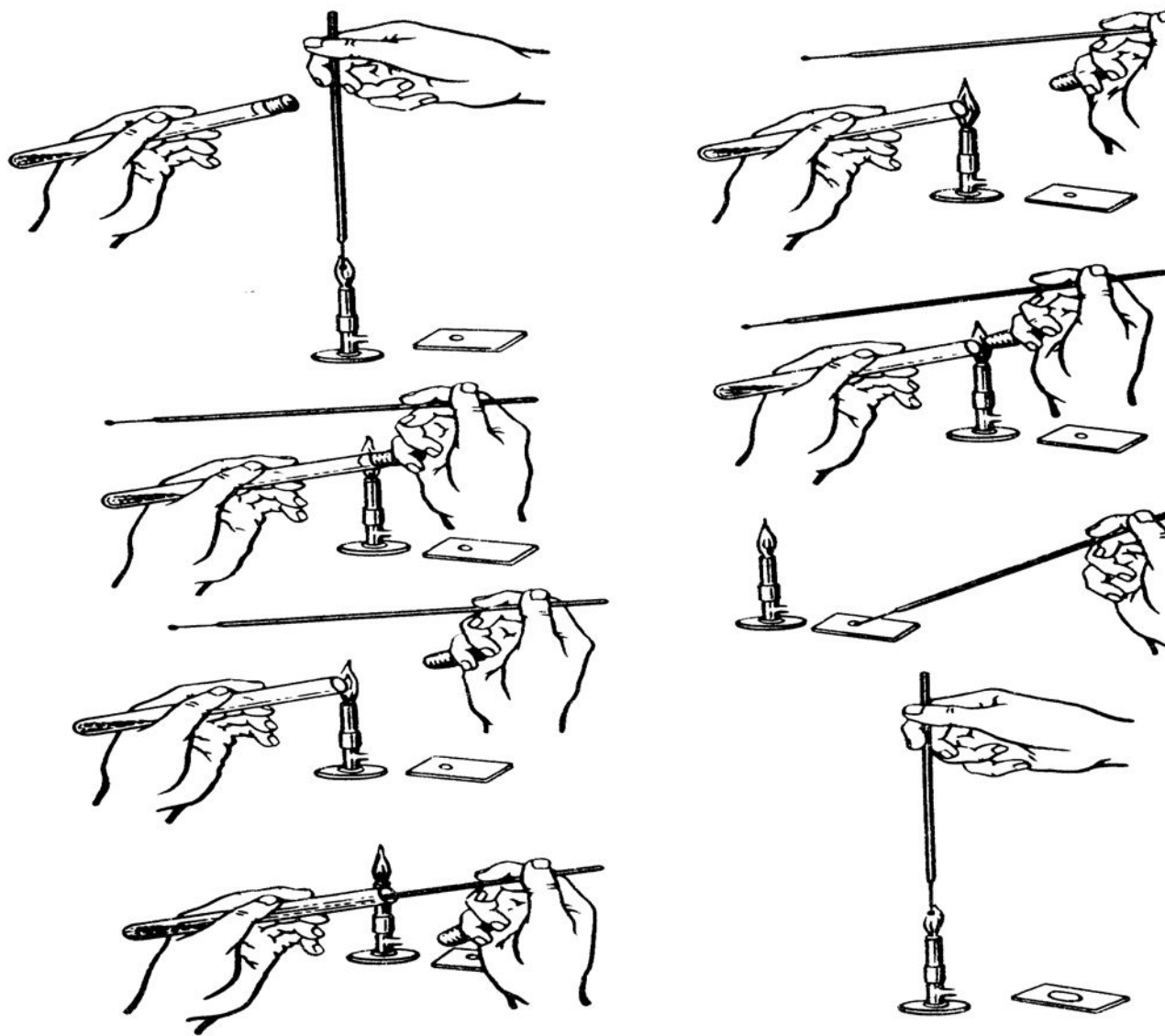
Кристаллы краски растворяют в 96 об.% спирте (5-10 г. краски и 100 мл. спирта). Для лучшего и более быстрого растворения кристаллы краски предварительно растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством спирта с добавлением нескольких капель глицерина.

Чисто спиртовой раствор для окраски непригоден, поэтому готовят спиртово-водный раствор: 10-20 мл. насыщенного спиртового раствора, 100 мл. дистиллированной воды.

3. Техника приготовления препаратов из культуры микробов и патологического материала

Приготовление мазка. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю водопроводной воды. Для обезжиривания стекол используют смесь этилового спирта и серного эфира в соотношении 1:1. Эти операции проводят вдали от горелок. Прокаленной бактериологической иглой из пробирки с культурой берут небольшое количество микробной массы и вносят в каплю воды. Каплю тщательно размазывают петлей по стеклу на площади около 4 кв.см.

Густую суспензию разводят водой. Для этого прокаленной петлей берут немного суспензии переносят в каплю воды на другое предметное стекло. Суспензию нормальной густоты размазывают тонким слоем по стеклу, затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или при слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке рекомендуется для предотвращения коагуляции белков, искажающей структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.



Порядок приготовления препарата - мазка

Фиксация мазка

Под фиксацией подразумевается такая обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами (в целях безопасности).

Фиксацию мазка проводят над пламенем горелки при исследовании формы клеток или при помощи химических соединений для изучения внутренней структуры клеток. В первом случае препарат 3-4 раза медленно проводят нижней стороной над пламенем горелки.

Во втором случае используют хромовые соединения, формалин, осмиевую кислоту, ацетон.

Один из распространенных приемов фиксации – обработка препарата 96%-ным спиртом или смесью равных объемов этилового спирта и эфира (жидкость Никифорова). Для этого препараты погружают на 10–30 мин. в фиксирующую жидкость.

Фиксированные препараты рассматривают под микроскопом в окрашенном виде.

Окрашивание препарата

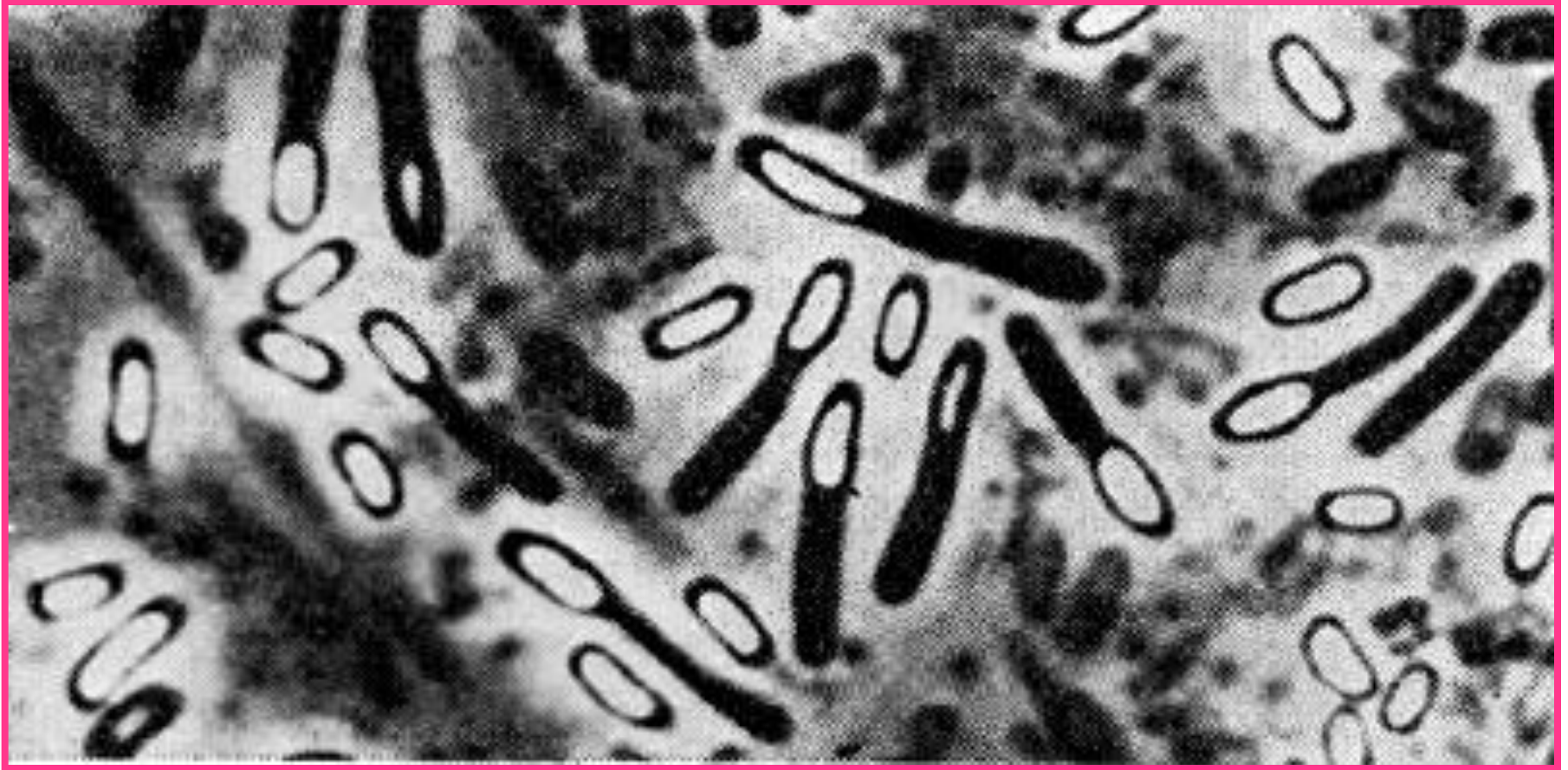
При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания варьирует от 1 до 5 мин, в отдельных случаях занимая до 30 мин и более. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

Простые и дифференцированные методы окраски

При **простой** окраске используют какой-либо один краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. При этом прокрашивается вся клетка.

Простая окраска:

- 1. Приготовить мазок.**
- 2. Высушить.**
- 3. Зафиксировать.**
- 4. Окрасить фуксином (метиленовым синим) 1-2 мин.**
- 5. Промыть водой.**
- 6. Высушить.**



Окрашенные клетки клостридий со спорами (простая окраска)

При **дифференцированной** окраске отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями. Таковы методы окраски по Граму, окраски спор.

Окраска клеток микроорганизмов по Граму

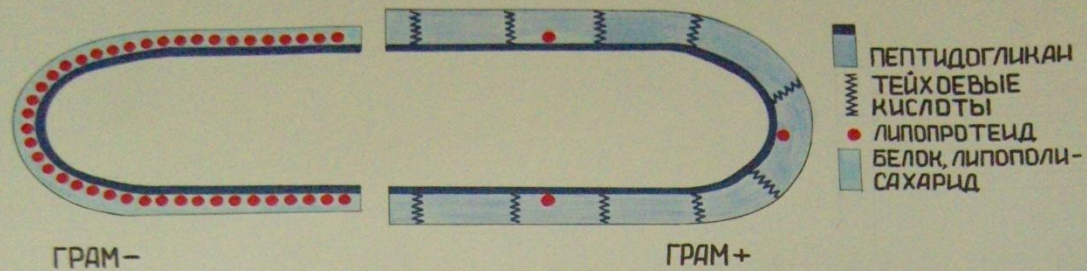
Этот метод основан на дифференциации микробных клеток по отношению химического состава их оболочек. В клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем, у других видов - соединение появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Микроорганизмов первой группы называют грамположительными, они окрашиваются в **сине-фиолетовый** цвет, второй – грамотрицательными, они окрашиваются в **красный** цвет.

Окраски по Граму:

1. Приготовить мазок.
2. Высушить.
3. Зафиксировать.
4. Окрасить генциан фиолетовым – 2 мин.
5. Обработать раствором Люголя – 2 мин.
6. Обесцветить спиртом 96 об.% – 30 сек.
7. Промыть водой.
8. Окрасить фуксином 1-2 мин.
9. Промыть водой.
10. Высушить.

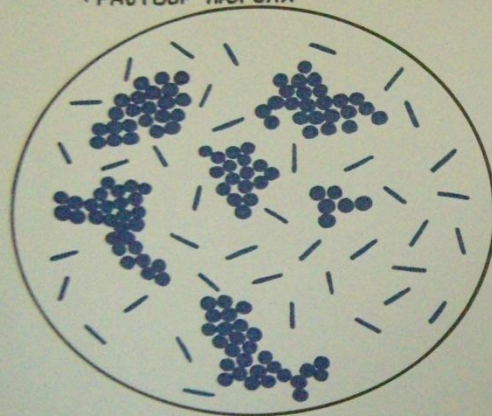
МЕТОД ГРАМА

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ

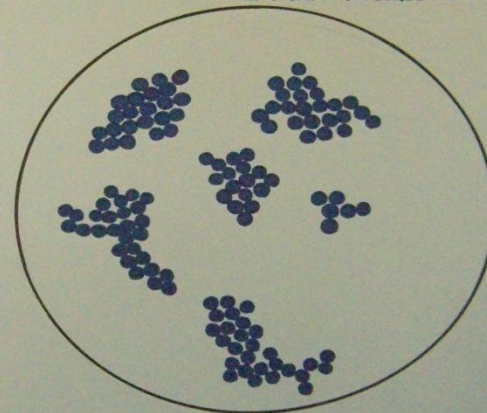


ЭТАПЫ ОКРАСКИ

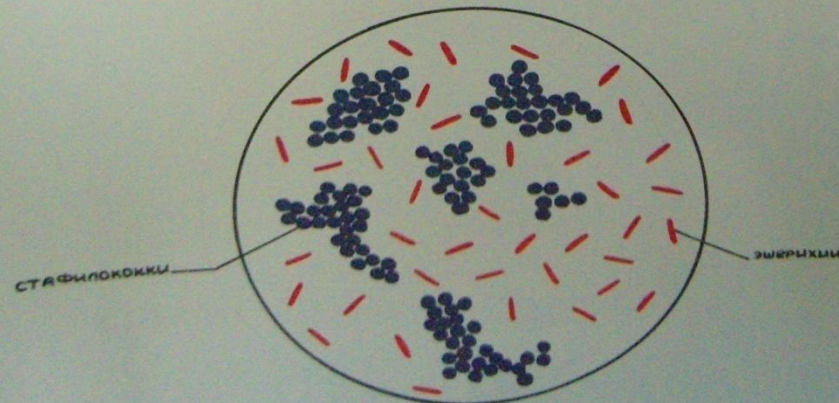
1. ГЕНЦИАН ФИОЛЕТОВЫЙ
+ РАСТВОР ЛЮГОЛЯ



2. СПИРТ (ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ)



3. ВОДНЫЙ ФУКСИН



Микроскопия препарата

На готовый препарат наносят каплю иммерсионного масла и исследуют с объективом 90. Обращают внимание на форму, расположение клеток кластридий, на характер спорообразования (кластридиальный или плектридиальный) и наличие зрелых спор. Микроскопическую картину зарисовывают.

4. Приготовить мазок с зубного налета, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.

Для исследования микроорганизмов полости рта человека, в том числе зубного налета, с помощью зубочистки снимают небольшое количество налета с зубов и вносят в каплю воды или физраствора на предметном стекле. Затем материал равномерно распределяют в капле тонким слоем и проводят окраску препарата по Граму. Микроскопическую картину исследуют, используя иммерсионную систему микроскопа. Обращают внимание на крупные клетки эпителия ротовой полости и более мелкие клетки бактерий. При поражении зубов **кариесом** отмечают присутствие **кокковой микрофлоры, крупных спорообразующих палочек, дрожжевых клеток**. Микроскопическую картину зарисовывают в альбоме, указывая увеличение микроскопа (90x10).

5. Провести микробиологический анализ воздуха по методу Коха

В воздухе доминируют пигментированные формы бактерий : *Micrococcus luteus*, *M. roseus*, *Sarcina ventriculi*, *Staphylococcus aureus*, *St. haemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, встречаются дрожжи и дрожжеподобные грибы – *Torula rosea*, *Candida* sp., споры бацилл (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*), актиномицетов (*Streptomyces album*, *S. griseus*), мицелиальных грибов (*Mucor* sp., *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Penicillium glaucum*, *P. cyclopium*, *P. nigricans*) и другие.

В период интенсивного движения транспорта городской воздух может содержать до 10 000 и более микробов в 1 куб. м., а в парковой пригородной зоне всего 200–400, что связано не только с сокращением источников загрязнения, но и с бактериями и фунгицидным действием фитонцидов растений.

Снижению численности микрофлоры в воздухе помещений способствует влажная уборка, проветривание, при необходимости – дезинфекция, т.к. в воздухе могут находиться возбудители пневмонии, туберкулеза, дифтерии, гриппа и других заболеваний.

Санитарно-показательными для воздуха являются определенные виды стрепто- и стафилококков прежде всего, а общая обсемененность не должна превышать 1500 куб.м. для жилых помещений и учреждений не медицинского профиля. Особо строгие требования предъявляются к воздуху лечебных, детских учреждений и помещений пищевых производств, где исключается присутствие патогенных и условно патогенных микробов, а общая обсемененность должна быть минимальная, как правило, не более 500 микроорганизмов в 1 куб.м.

Для анализа воздушной микрофлоры **седиментационным** методом (**метод Коха**) чашки Петри с МПА (СА или другими средами) открывают на 5 мин. в исследуемом помещении. Затем закрывают, подписывают и ставят в термостат (28–30°C).

Учет колоний бактерий проводят на 3–5 сутки, грибов и актиномицетов на 7–10 сутки.

Анализ воздуха в помещениях и вне их проводят инструментально, используя приборы, обеспечивающие принудительный его поток на поверхность питательных сред. Наиболее доступный метод отбора воздуха во внешней среде сводится к использованию **стерильных шприцов**. Далее воздух продувается через жидкость с целью концентрации микроорганизмов и дальнейшей транспортировки проб для исследования количественного и качественного состава микрофлоры.



Пробоотборник воздуха MAS- 100Еco

Прибор MAS 100 Eсо используют для контроля воздуха при производстве продуктов питания, в лечебных учреждениях и других помещений. Для работы используют стандартные чашки Петри с питательными средами. Можно установить нужный объем воздуха от 1 до 1000 л, скорость потока воздуха 100 л/мин.

Наряду с седиментационными методами учета микроорганизмов воздуха используют фильтрационный метод, метод продувки воздуха через жидкость, что позволяет концентрировать клетки и споры микроорганизмов, численность которых учитывается методом посева на плотные среды.

Благодарю за внимание!