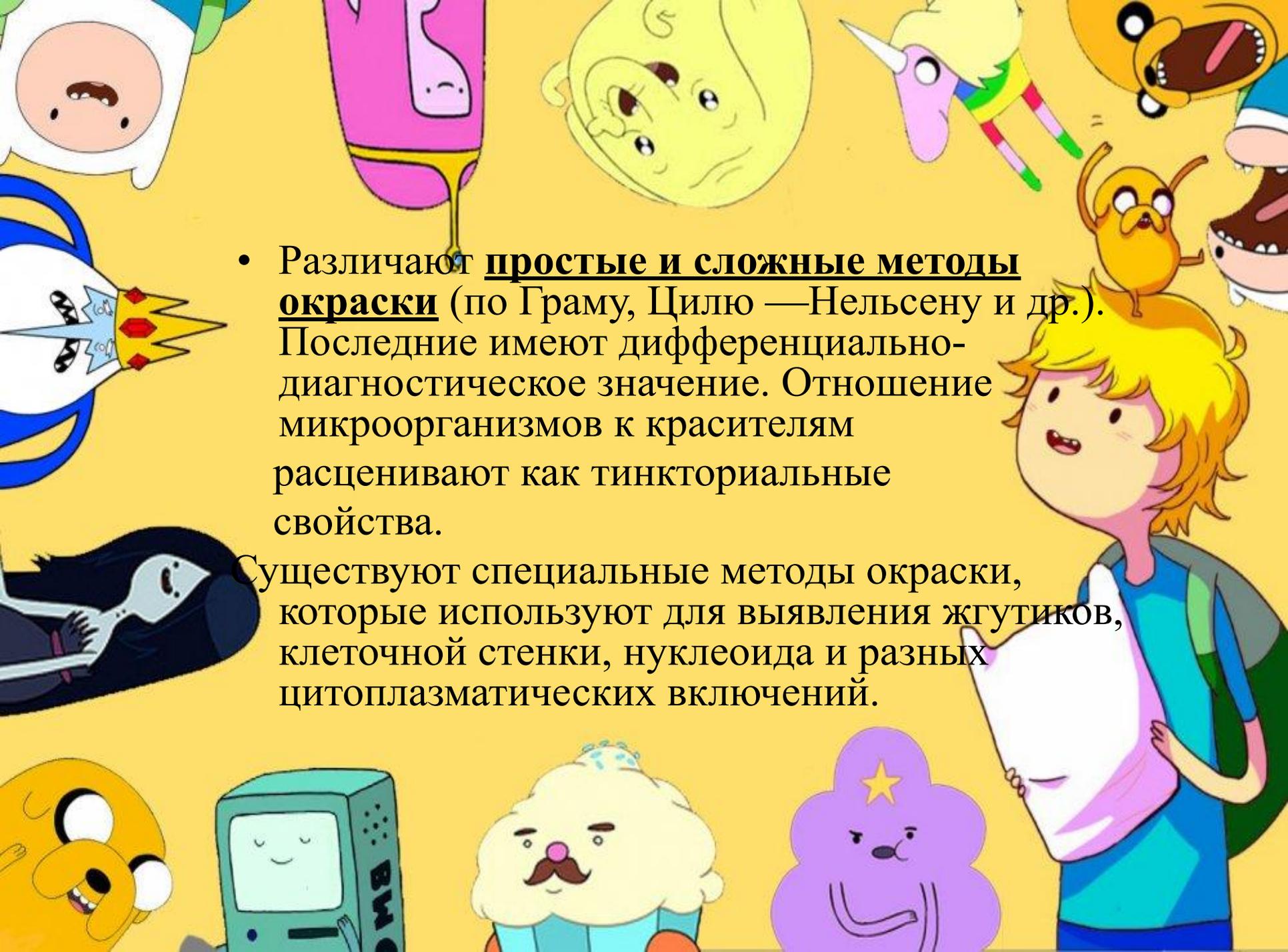




Методы исследования и  
культивирования  
микроорганизмов

- Для изучения морфологии бактерий из них готовят **нативные (прижизненные) препараты и фиксированные мазки**, которые окрашивают анилиновым красителем. В основе окраски лежат сложные химические и физико-химические реакции. Протоплазма бактерий, особенно в фиксированных мазках, обладает сродством к основным красителям. Поэтому для их окраски используют главным образом основные красители: **метиленовый синий, кристаллический фиолетовый, везувин и др.** Для выявления различных структурных элементов в бактериальной клетке применяют нейтральные и кислые краски.



- 
- Различают простые и сложные методы окраски (по Граму, Цилю — Нельсену и др.). Последние имеют дифференциально-диагностическое значение. Отношение микроорганизмов к красителям расценивают как тинкториальные свойства.

Существуют специальные методы окраски, которые используют для выявления жгутиков, клеточной стенки, нуклеоида и разных цитоплазматических включений.

# Приготовление препаратов для микроскопического исследования.

- **Взятие материала для исследования.** Для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки, колбы или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой.

Пробирку с бактериальной культурой берут в левую руку, а петлю за петледержатель — в правую. Петлю прожигают в пламени горелки до покраснения. Вращательным движением вынимают из пробирки ватную пробку, прижимая ее V и IV пальцами правой руки к ладони, и обжигают край пробирки. Осторожно вводят петлю в пробирку, охлаждая ее о внутреннюю поверхность, после чего легким скользящим движением берут материал. Затем вынимают петлю из пробирки, снова обжигают ее край и затыкают пробкой. После приготовления препарата петлю обязательно прожигают (стерилизуют) в пламени. Жидкий материал из пробирки или колбы можно набирать пипеткой, удерживая ее в правой руке и закрывая отверстие II пальцем.

# Приготовление препаратов для изучения микроорганизмов в живом состоянии.

**Метод «висячей» капли.** Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной культуры. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. **Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или края.** Для микроскопии вначале используют малый сухой объектив 8, под увеличением которого находят край капли, а затем устанавливают объектив 40 и исследуют препарат.



**Метод «раздавленной» капли.** На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают ее покровным стеклом. Капля должна быть небольшой, не выходящей за край покровного стекла. Микроскопируют препарат с объективом 40.

# Приготовление фиксированных препаратов-мазков.

Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром около 1—1,5 см, только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки.

Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей его непосредственно наносят на предметное стекло и готовят мазок.

Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.





Для фиксации мазка предметное стекло (мазком вверх) медленно проводят 3 раза (в течение 3 с) через пламя горелки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла, и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей и в некоторых случаях мазки из культур микроорганизмов фиксируют погружением на 5—20 мин в метиловый или этиловый спирт, смесь Никифорова, сулемовый спирт или другие фиксирующие жидкости.

# Методы окраски мазков

- **Простой метод.** Фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например фуксином водным (1—2 мин) или метиленовым синим (3—5 мин), промывают водой, высушивают и микроскопируют.
- **Сложные методы.** Включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.



# Окраска по методу Грама.

1. На фиксированный мазок наносят карболово-спиртовой раствор генцианового фиолетового через полоску фильтровальной бумаги. Через 1—2 мин ее снимают, а краситель сливают..
2. Наносят раствор Люголя на 1—2 мин.
3. Обесцвечивают препарат этиловым спиртом в течение 30—60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
4. Промывают препарат водой.
5. Докрашивают мазок водным раствором фуксина в течение 1—2 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные — в красный



- Окраска по Граму имеет важное дифференциально-диагностическое значение и широко используется в микробиологии. К грамположительным бактериям относятся стафилококки, стрептококки, коринебактерии дифтерии, микобактерии туберкулеза и др., к грамотрицательным—гонококки, менингококки, кишечная палочка и др. Некоторые виды бактерий могут окрашиваться по Граму variabelно в зависимости от возраста, особенностей культивирования и других факторов, изменяющих структуру клеточной стенки



Основная ошибка, допускаемая при окраске по Граму, **состоит в переобесцвечивании или недообесцвечивании мазка спиртом.**

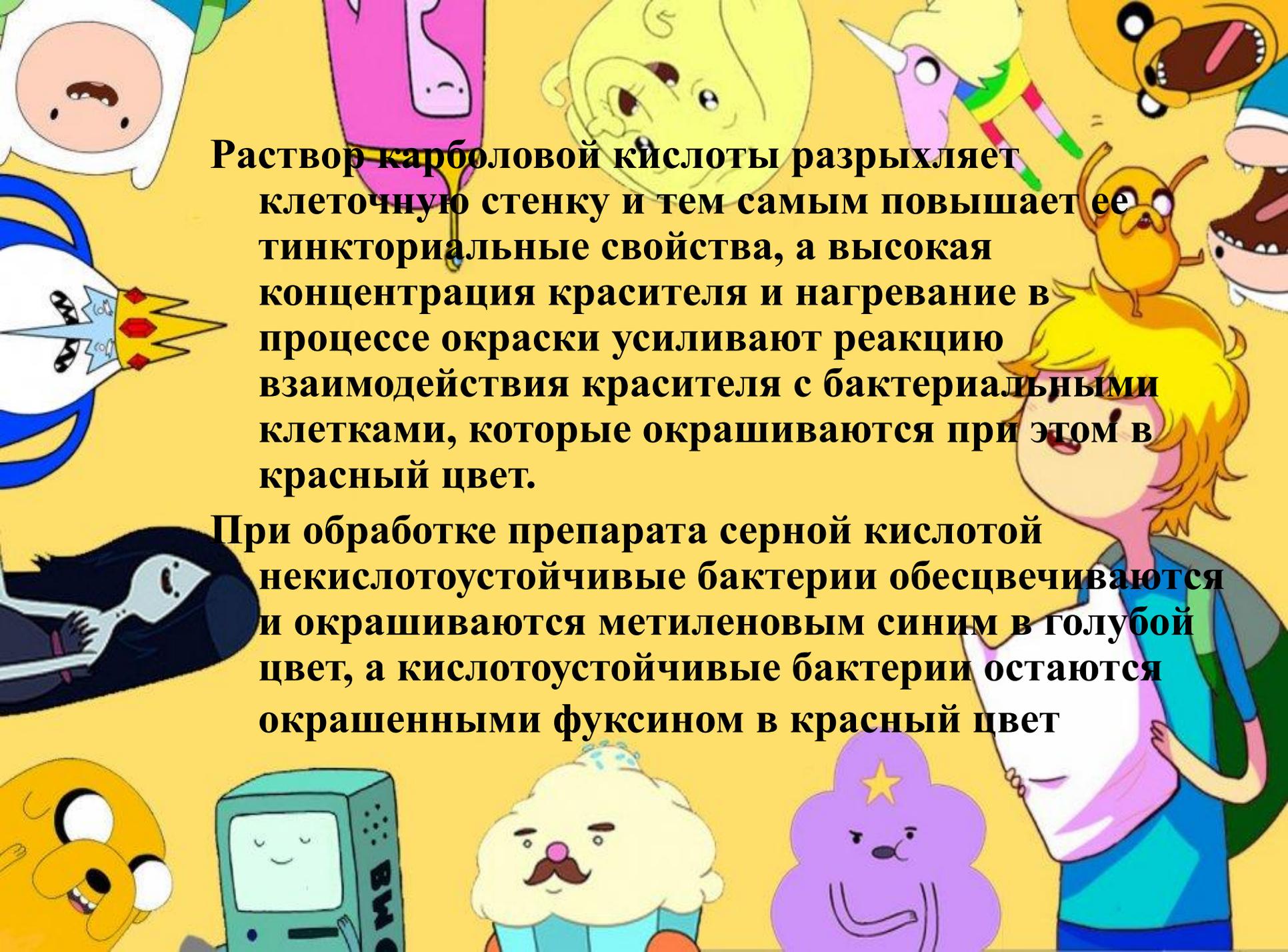
В первом случае грамположительные бактерии могут утрачивать первоначальную окраску генциановым фиолетовым и приобретать красный цвет (характерный для грамотрицательных бактерий) в результате последующей докраски мазка фуксином.

Во втором случае грамотрицательные бактерии могут сохранять сине-фиолетовый цвет генцианового фиолетового. Для правильной окраски следует строго соблюдать технику обесцвечивания



# Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля— Нельсена.

1. На фиксированный мазок наносят карболовый раствор фуксина через полоску фильтровальной бумаги и подогревают до появления паров в течение 3—5 мин.
2. Снимают бумагу, промывают мазок водой.
3. На мазок наносят 5% раствор серной кислоты или 3% раствор солянокислого спирта на 1—2 мин для обесцвечивания.
4. Промывают водой.
5. Докрашивают мазок водным раствором метиленового синего в течение 3—5 мин.
6. Промывают водой, высушивают и микроскопируют. Кислотоустойчивость обусловлена наличием в клеточной стенке и цитоплазме бактерий повышенного количества липидов, воска и оксикислот, в частности миколовой кислоты.



**Раствор карболовой кислоты разрыхляет клеточную стенку и тем самым повышает ее тинкториальные свойства, а высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливают реакцию взаимодействия красителя с бактериальными клетками, которые окрашиваются при этом в красный цвет.**

**При обработке препарата серной кислотой некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые бактерии остаются окрашенными фуксином в красный цвет**

# Окраска спор по методу Ожешки.

1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают на пламени горелки в течение 2—3 мин.
2. Кислоту сливают, препарат промывают водой, просушивают и фиксируют над пламенем горелки.
3. Окрашивают препарат по Цилю — Нельсену. Споры бактерий при этом приобретают красный цвет, а вегетативные формы — синий.



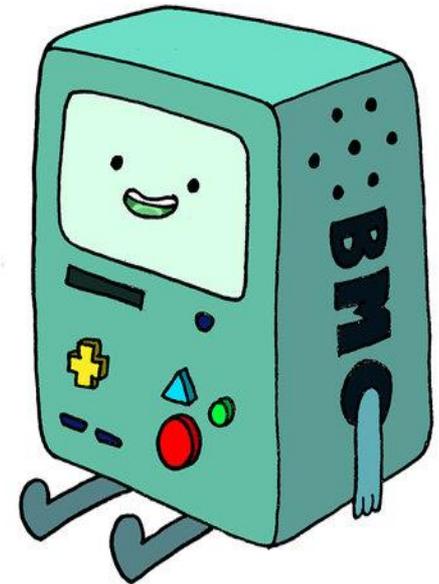
# Окраска зерен волютина по методу Нейссера.

1. На фиксированный мазок наносят ацетат синьки Нейссера на 2—3 мин.
2. Наносят раствор Люголя на 10—30 с.
3. Промывают препарат водой.
4. Мазок докрашивают водным раствором везувина или хризоидина в течение 54—1 мин.
5. Промывают водой, высушивают и микроскопируют. Зерна волютина представляют собой соединения, имеющие в отличие от цитоплазмы щелочную реакцию и поэтому избирательно воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в темно-синий цвет. Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель везувин и окрашивается в желтый цвет



# Обнаружение капсул по методу Бурри—Гинса.

1. Готовят препарат по Бурри: смешивают каплю взвеси микробов с каплей туши и при помощи стекла со шлифовальным краем готовят мазок так же, как мазки из крови; затем его высушивают и фиксируют.
2. На мазок наносят водный раствор фуксина на 1—2 мин.
3. Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. При этом бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черно-розовом фоне



# Измерение микробов



Все микроскопические объекты измеряются в нанометрах (нм) и микрометрах (мкм): 1 мкм—КГЗ мм; 1 нм—Ю-8 мм; 1 мкм— —1000 нм. Для измерения микробов применяются окуляр-микрометр и объект-микрометр. Окуляр-микрометр служит для непосредственного измерения объекта и представляет собой стеклянную пластинку, в центральной части которой нанесена шкала с 50 делениями. Объект-микрометр представляет собой стекло, в середине которого имеется эталонная шкала, разделенная на 100 частей. Деление шкалы равно 10 мкм.

Ну все

