Сложные методы окраски. Окраска спор и кислотоустойчивых бактерий (КУМ)

Практическое занятие №5

Основные методы изучения бактерий и виды красителей

- В нативном (естественном) состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, поэтому они невидимы при микроскопическом исследовании.
- Окраска микроорганизмов позволяет изучить морфологические особенности микробов

Основные виды красителей, которые применяются в микробиологической практике:

Дают следующее окрашивание				
красное	**голубое (синее)**	**фиолетовое**	**желто-коричневое**	**зеленое**
фуксин основной, нейтральный красный, конго красный	метиленовый и толуидиновый синий	генцианвиолет, метиленовый фиолетовый	хризоидин везувин	бриллиантовый зеленый, малахитовый зеленый

Сложные методы окраски

Дифференциальные

- Метод Грама – дифференцирует грамположительные и грамотрицательные бактерии – важный таксономический признак
- Метод Циля-Нильсена – дифференцирует кислотоустойчивые и некислотоустойчивые бактерии – принципиальное значение в диагностике туберкулеза

Выявляющие структуры бактериальной клетки

- Метод Ожешко – споры
- Метод Бурри-Гинса – капсула
- Метод Нейссера – включения волютина
- Метод Пешкова – клеточная стенка
- Метод Романовского-Гимзы – ***универсальный*** – окраска нуклеоида, риккетсий, хламидий, спирохет

Протравы и дифференцирующие вещества применяемые в сложных методах окраски

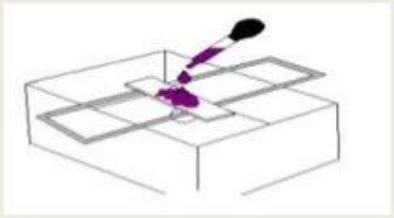
- **Протравы** – физические и химические факторы, обладающие свойствами повышать окрашиваемость микробов. Уплотняя цитоплазму, они могут делать окраску более прочной, или усиливать красящие свойства красителя, или разрыхлять оболочки клеток, спор, способствуя проникновению краски в клетку.

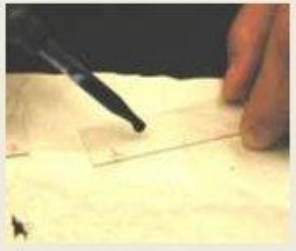
  Протравами обрабатывают мазок:

- а) перед окрашиванием – воздействуя раствором HCl при окраске спор у бактерий в методе Ожешки,
- б) в момент окраски – фенол и высокая температура (подогревание препарата) в методе Циля-Нильсена;
- в) после нанесения краски для ее закрепления – раствор Люголя в методе Грама.

- **Дифференцирующие вещества** избирательно обесцвечивают одни виды или структуры бактериальных клеток и не обесцвечивают другие. Например: этиловый спирт в окраске по Граму, серная кислота в методах Циль-Нильсена и Ожешки.

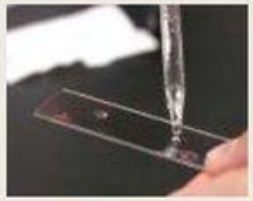
Методы окраски и морфология микроорганизмов

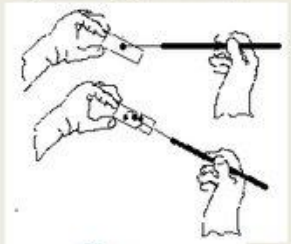




1. Техника приготовления фиксированного мазка
2. Метод Циля-Нильсена
3. Метод выявления спор по Ожешко

Техника приготовления фиксированного мазка

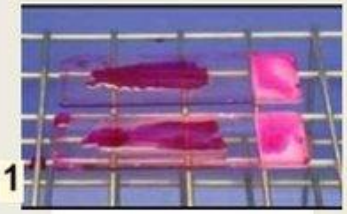




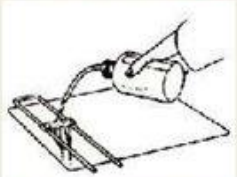
- *Фиксированный мазок* – основа большинства методов окраски
- На обезжиренное предметное стекло наносят бактериальной петлей маленькую каплю исследуемой жидкости; воды или стерильного физиологического раствора и бактериологической петлей переносят в нее небольшое количество исследуемого материала.
- Полученную суспензию равномерно распределяют тонким слоем на площади 1 – 2 см петлей.
- Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе. Для ускорения высушивания допускается подогревание мазка в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки.
- Высушенный мазок фиксируют в пламени горелки.
- *Фиксация* мазка является обязательной процедурой, в результате которой микробы погибают, прочно прикрепляются к стеклу и значительно лучше воспринимают окраску.

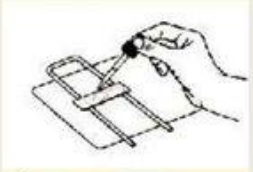
Метод Циля-Нильсена

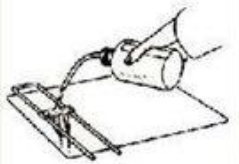
цель метода	Выявление кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий
основной краситель	карболовый раствор фуксина
протрава	карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	Окрашивать карболовым раствором фуксина (фуксин Циля) через фильтровальную бумажку при осторожном нагревании над пламенем спиртовки 3 раза до появления паров белого цвета (1); Промыть в 5% серной кислоте; Промыть водой; Окрасить раствором метиленового синего 1 мин.; Промыть водой; Высушить
сущность метода	При частичном гидролизе клеточной стенки фуксин взаимодействует с миколовыми кислотами и образует комплекс в присутствии фенола

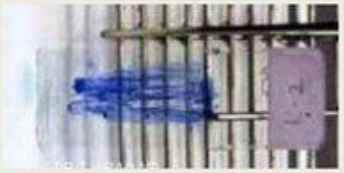

1

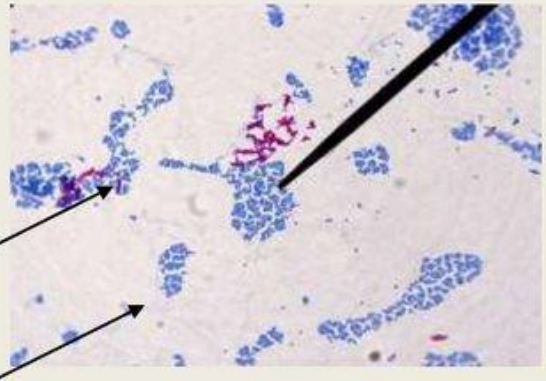
2 дифференциация в серной кислоте 20 сек.


3 Промывка водой


4 окрашивание метиленовым синим

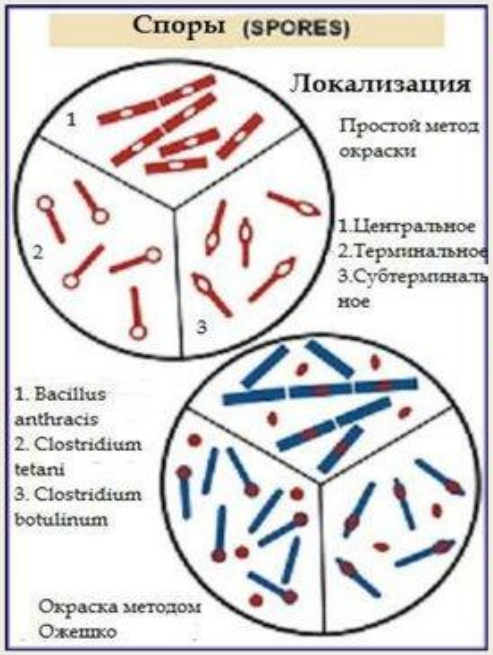

5 Промывка водой





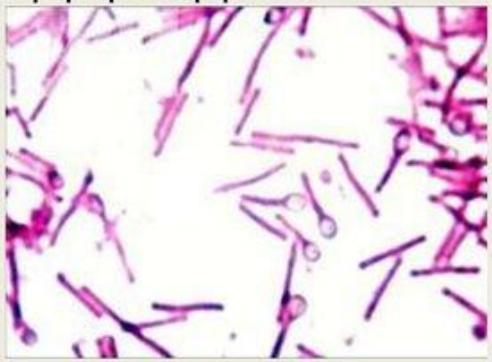
Кислотоустойчивые – Mycobacterium-красные;
некислотоустойчивые – Staphylococcus-синие

Методы выявления спор



- При простом способе окраски спора не прокрашивается – в этом случае видны только эндоспоры как бесцветные образования в клетке
- Эндоспоры в теле клетки может располагаться:
  - 1. центрально — возбудитель сибирской язвы Bacillus anthracis;
  - 2. терминально — на конце палочки (возбудитель столбняка Clostridium Tetani);
  - 3. субтерминально — ближе к концу (возбудитель ботулизма, Clostridium botulinum).
- Способность бактерий образовывать споры, различающиеся по форме размерам и локализации в клетке, является таксономическим признаком, который используется для их дифференцировки

1. Bacillus anthracis



2. Clostridium Tetani

3. Clostridium Botulinum

Методы выявления спор. Метод Ожешко

цель метода	Выявление спор у бактерий
основной краситель	фуксин Циля
протрава	соляная кислота (до окрашивания), карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	На высушенный мазок наложить фильтровальную бумажку, налить 0,5% раствор соляной кислоты и нагревать над пламенем спиртовки до появления пара 3 раза; Далее окрашивать по Цилю-Нильсену.
сущность метода	Внутренние оболочки споры содержат большое количество липидов, которые придают ей свойство кислотоустойчивости

Споры малиновые, видны как эндоспоры внутри вегетативных клеток , так и отдельные споры

Вегетативные клетки синие