

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В.
Верецагина»

Факультет ветеринарной медицины и биотехнологий

Кафедра эпизоотологии и микробиологии

Техника приготовления и окраски микропрепарата

Методические указания для проведения лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы микробиологии» для студентов по специальности 36.02.01 – Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

УДК 579 (071)
ББК 28.4 р 30
Т 381

Составитель -
Канд.вет. наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии
Е.Н. Закрепина

Рецензенты:
Доктор. вет. наук, профессор кафедры эпизоотологии и микробиологии
А.Л. Кряжев
Ст. преподаватель кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства
Е.С. Баруздина

Т 381 Техника приготовления и окраски микропрепарата: Методические указания/ Сост.
Е.Н. Закрепина. – Вологда – Молочное: ВГМХА, 2024.- 14

В методических указаниях подробно описана техника приготовления микропрепарата.
Приведены методы окраски мазков, в том числе широко применяемая в бактериологии
окраска по Граму.

Методические указания для проведения лабораторно-практических занятий по
дисциплине «Основы микробиологии» для студентов по специальности 36.02.01 –
Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

Печатается по решению редакционно-издательского совета Вологодской государственной
молочнохозяйственной академии имени Н.В.Верещагина.

Введение

Дисциплина микробиология занимает одно из ведущих мест в учебном процессе подготовки квалифицированного специалиста. Микроорганизмы широко распространены в окружающем нас мире: воздухе, воде, почве, продуктах питания и кормах, а также в организме человека и животных. Именно бактерии осуществляют такие глобальные процессы как брожение, гниение и т.д., участвуют в преобразовании соединений азота, углерода и других веществ. Однако, не все микроорганизмы относятся к полезным. Нас постоянно окружают патогенные, условно-патогенные и технически вредные бактерии, которые также являются объектами изучения науки микробиологии.

Исследование микрофлоры различных объектов и материалов проводится в бактериологической лаборатории. Начальным этапом этой работы является приготовление микропрепарата.

1 Материальное обеспечение

1. Инструменты и оборудование: световые микроскопы; лабораторная посуда (пробирки малые, колбы, пипетки химические, пипетки автоматические, чашки Петри), спиртовые горелки, предметные стекла, штативы для пробирок.

2. Материалы для лабораторных занятий: чистые культуры бактерий, физиологический раствор, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, наборы бактериальных красок.

2 Правила работы в бактериологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует соблюдения правил техники безопасности и личной гигиены, т.к. даже если в лаборатории не проводятся работы с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, они могут быть выделены из окружающей среды или различных объектов в процессе работы. Основными правилами работы студентов в микробиологической лаборатории являются следующие:

1. В помещение лаборатории не допускаются посторонние люди и животные.
2. Сотрудники лаборатории должны работать в спецодежде: халате (белом, чистом, выглаженном и застегнутом), шапочке или косынке, а при необходимости - в марлевой повязке, перчатках и т.д.
3. В помещениях лаборатории запрещается есть, пить, курить, приносить посторонние вещи, а особенно продукты питания (личные вещи складывают в специально отведенном месте).
4. На рабочем месте должно находиться только нужное для работы оборудование.
5. Начинать и заканчивать работу студенты должны только с разрешения преподавателя.
6. При использовании спиртовок необходимо соблюдать особые меры безопасности (следить за их герметичностью, не вынимать фитиль из горячей спиртовки, не зажигать одну спиртовку от другой, не пользоваться спиртовкой вблизи

легковоспламеняющихся жидкостей, не оставлять горящую спиртовку без присмотра, пламя гасить только колпачком).

7. Студенты не должны включать, выключать и пользоваться электрическими приборами без разрешения преподавателя.

8. Во избежание инфицирования рук работника необходимо работать только бактериологической петлей и пинцетом. Использованные инструменты и материалы необходимо фламбировать (прожигать над пламенем горелки) или помещать в дезинфицирующий раствор.

9. Если в процессе работы материал, содержащий микроорганизмы, попал на кожу рук, лица, наружную слизистую оболочку глаз, носа или рта, нужно срочно сообщить преподавателю и провести необходимые меры по обеззараживанию.

10. При попадании на поверхность стола материала, содержащего микроорганизмы, необходимо смоченным в 70% этиловом спирте или в 3% водном растворе хлорамина тампоном обработать загрязненные места.

11. Мазки из исследуемого материала, содержащего микроорганизмы, необходимо зафиксировать физическим или химическим способом.

12. Во время работы не допускается класть инструменты и пробки открытых пробирок, колб на стол.

13. По окончании работы лабораторная посуда с засеянными микроорганизмами средами маркируется и помещается в термостат для дальнейшего культивирования.

14. Отработанный материал, лабораторная посуда, инструменты и культуры микроорганизмов выносить за пределы лаборатории строго запрещается.

15. По окончании работы студент обязан привести в порядок своё рабочее место, сдать культуры микроорганизмов преподавателю и вымыть руки.

3 Техника приготовления микропрепарата

В микробиологической лаборатории для исследования формы, размеров, тинкториальных и других свойств микроорганизмов готовят **микропрепараты (мазки)**.

Микропрепарат (мазок) — небольшое количество материала, содержащего микроорганизмы, нанесенное на предметное стекло и подготовленное особым образом.



Рис. 1. Набор лабораторной посуды и красителей, необходимые для приготовления микропрепаратов

Чаще всего при исследовании микроорганизмов готовят препараты фиксированных микробных клеток. В этом процессе выделяют этапы:

- 1 этап: подготовка предметных стекол.
- 2 этап: приготовление микропрепарата (мазка).
- 3 этап: фиксация микропрепарата (мазка).
- 4 этап: окраска микропрепарата (мазка).

1. Подготовка предметных стекол. Перед работой новые предметные стекла моют и хорошо обезжиривают. Стекла уже бывшие в употреблении кипятят в растворе соды (мыла) не менее одного часа, затем промывают чистой водой и обезжиривают. Хранят предметные стекла в банках с притертыми крышками или в чашках Петри. Непосредственно перед работой предметное стекло кладут пинцетом на рабочий стол или стеклянный мостик, уложенный на стеклянную ванночку.

2. Приготовление микропрепарата (мазка). Мазок готовят из культуры микроорганизмов, выросших в пробирках, колбах или на чашках Петри. Часто предварительно на предметное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора (чтобы приготовить тонкий ровный мазок).

2.1. Готовят рабочее место: пробирку с культурой микроорганизмов (материалом), пробирку с физиологическим раствором и бактериологическую петлю (пипетку) ставят в штатив перед собой.

2.2. Проверяют спиртовку (наличие фитиля, спирта и т.д.) и ставят перед собой.

2.3. Зажигают спиртовку. Исползованную спичку кладут в чашку Петри.

2.4. Фламбируют (прокаливают в пламени спиртовки) бактериологическую петлю 1 минуту горизонтальными и 1 минуту вертикальными движениями, пронося в пламени всю металлическую часть петли. При этом бактериологическую петлю держат правой рукой также как шариковую ручку.

2.5. Прокаленной бактериологической петлей (стерильной пипеткой) (рис. 2-1) набирают из пробирки (колбы) каплю стерильного физиологического раствора и наносят в центр предметного стекла. Петлю снова фламбируют в течении нескольких секунд.

2.6. Пробирку с культурой микроорганизмов берут в левую руку таким образом, чтобы видна была питательная среда (рис.2-2). Очень быстро (!) проносят горлышко пробирки и пробку в пламени спиртовки для стерилизации.

2.7. Вблизи пламени, не выпуская бактериологической петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки (или прижав мизинцем к руке) сжимают ватную пробку и вынимают ее из пробирки (рис.2-3).

2.8. Петлю вводят в пробирку и берут небольшое количество микробной массы (материала) (рис.2-4).

2.9. Горлышко пробирки и ватную пробку снова обжигают, пронося друг навстречу другу, и пробирку закрывают ватной пробкой над пламенем спиртовки (рис.2-5, рис.2-6).

2.10. Культуру микроорганизмов (материал) переносят петлей в каплю физиологического раствора на предметном стекле и равномерно распределяют ее круговыми (рис.2-7). Таким образом формируют мазок на площади 1-2 см². Не следует вносить в каплю физиологического раствора большое количество микробной массы, так как мазок получится толстым, плохо прокрасится и будет неудобным для исследования.

2.11. Остаток микробной массы на бактериологической петле быстро сжигают в пламени горелки (рис.2-8). При этом петлю накаливают до красна.

2.12. Предметное стекло просушивают на воздухе или над пламенем горелки (на таком уровне, где не горячо руке исследователя) держа мазком вверх. Предметное стекло нельзя интенсивно нагревать, так как бактериальные клетки в мазке могут деформироваться.

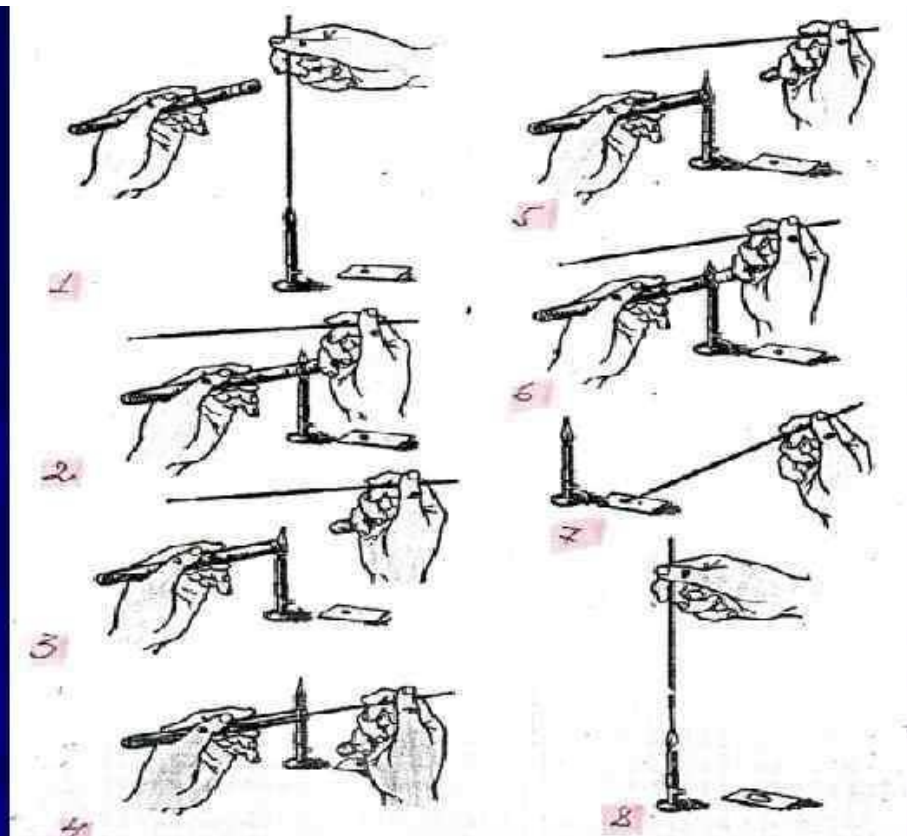


Схема приготовления мазка

Рис. 2. Порядок приготовления микропрепарата (мазка)

3. Фиксация микропрепарата (мазка). После высушивания мазка необходимо его зафиксировать. Основными целями фиксации являются:

- гибель микробных клеток (таким образом даже патогенные бактерии становятся неопасными).
- прикрепление (прилипание, фиксация) микроорганизмов к стеклу для предотвращения их смывания в процессе окрашивания.
- интенсификация процесса окрашивания.

В лабораторной работе применяют **физическую (термическую)** или **химическую фиксацию**. Для **термической фиксации** используют пламя горелки. Для этого кончиками пальцев правой руки (пинцетом) захватывают предметное стекло мазком вверх и трижды проводят через язычок пламени. Затем перед окрашиванием препарат охлаждают на воздухе.

При исследовании внутреннего строения клетки, которое может измениться при термической фиксации, используют **химическая фиксацию**. Для этого чаще всего применяют ацетон с выдержкой в 5-7 минут, этиловый спирт (10-20 минут), смесь Никифорова (10-20 минут). Микропрепарат помещают в стаканчик с фиксирующей жидкостью или наносят жидкость на мазок из пипетки. После фиксации препарат споласкивают дистиллированной водой.

4. Окраска препарата. Так как большинство микроорганизмов не имеют собственной окраски, для того чтобы рассмотреть их в микроскоп нужно провести окраску микропрепарата (мазка).

4 Окраска микропрепарата

Существуют простые и сложные способы окрашивания. Для **простого окрашивания** используют один из анилиновых красителей. Чаще всего это основные красители в виде рабочего (водного) раствора. При окрашивании фиксированный препарат помещают на стеклянный мостик, лежащий на стеклянной (металлической)

кювете, и наносят на стекло из пипетки раствор выбранного красителя таким образом, чтобы он полностью покрывал весь мазок. Продолжительность окрашивания анилиновыми красителями колеблется от 1 до 3 минут. Затем мазок промывают водой. Затем с мазка сливают остатки воды, помещают между полосками фильтровальной бумаги и подсушивают. При необходимости фильтровальную бумагу меняют. С помощью простых методов окрашивания невозможно провести дифференцировку микробных клеток. Поэтому их применяют в том случае, когда работают с микроорганизмами, относящимися к одной определенной группе (молочнокислые бактерии, дрожжи и т.д.).

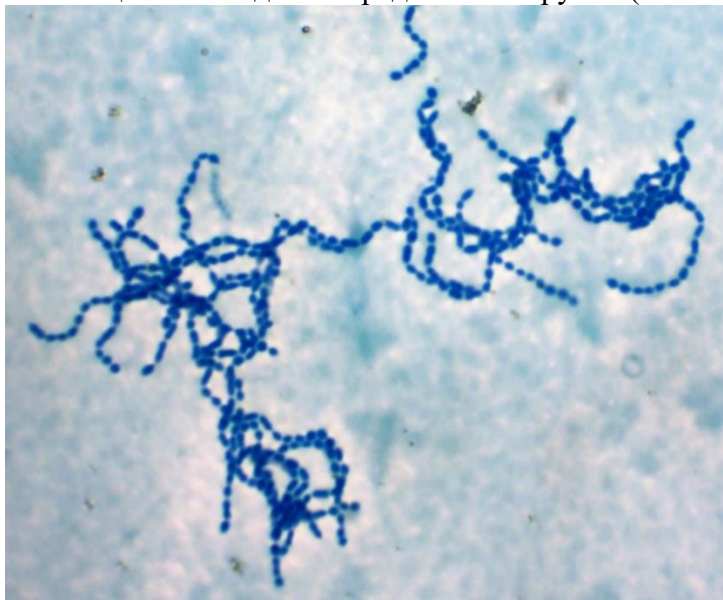


Рис. 3. Стрептококки под микроскопом (окраска метиленовым синим)

Сложное окрашивание микроорганизмов используют для дифференцированной окраски бактерий, отдельных структур и органоидов их клетки, различных включений цитоплазмы. При сложном окрашивании используют несколько различных красителей, необходимые вспомогательные вещества, различные способы фиксации и подготовки препарата. К сложным методам окрашивания микроорганизмов относят окраску по Граму, окраску спор, окраску цитоплазматических включений, некоторых групп патогенных микроорганизмов (микобактерий, бруцелл) и др.

Наибольшее применение в бактериологии нашел метод **окраски по Граму**.



- В 1884 г. Кристиан Грам предложил оригинальный метод окраски бактерий
- После окраски по Граму одни бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет – их называют Грам-положительными (Гр +)
- Другие окрашиваются в красный цвет – их называют Грам-отрицательными (Гр -)

Рис. 4. Ганс Кристиан Грам.

Метод окраски микроорганизмов по Граму основан на способности некоторых видов микроорганизмов образовывать в клеточной стенке прочное соединение **генцианвиолета (кристалвиолета) с йодом**. Это связано с наличием в клеточных оболочках **пептидогликана**. В результате последовательной обработки генцианвиолетом (кристалвиолетом) и йодом образуется прочный комплекс, который не разрушается 96%-ным этанолом в течении 30 секунд. Поскольку генцианвиолет имеет фиолетовый цвет, то и бактерии приобретают фиолетовую окраску. Эти бактерии называют **грамположительными или грампозитивными**. Если в клеточной стенке микроорганизмов такого прочного соединения не образуется (отсутствие или малое количество пептидогликана), то в течении 30 секунд краска смывается этанолом, в результате чего бактерии обесцвечиваются и их необходимо дополнительно докрасить другим красителем (фуксином), который имеет малиновый цвет. Эти микроорганизмы окрашиваются в ярко малиновый (розовый) цвет и называются **грамотрицательными или грамотрицательными**.

Окраска по Граму

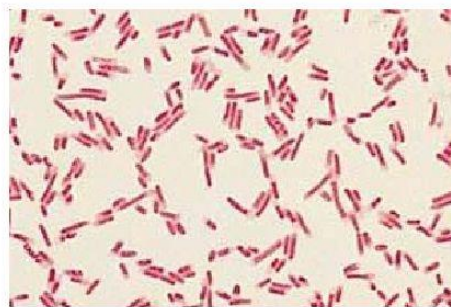
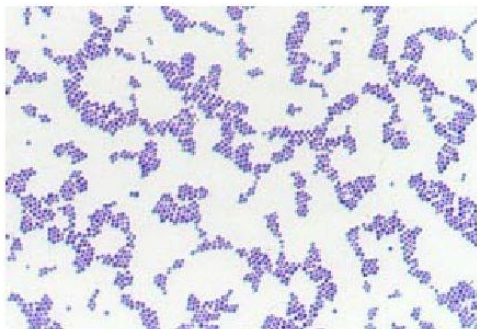


Рис. 5. Грамположительные кокки и грамотрицательные палочки.

Отношение бактерий к окраске по Граму может меняться в зависимости от возраста культуры микроорганизмов, условий её культивирования. Это необходимо учитывать в работе: исследовать молодые клетки, выращенные в стандартных условиях.

Окрашивание бактерий по Граму проводят в следующей последовательности:

1. На фиксированный мазок пипеткой наносят раствор генцианвиолета (кристалвиолета) и выдерживают в течение 1-2 минут (при необходимости предварительно кладут на мазок кусочек фильтровальной бумаги).

3. По окончании окрашивания краску сливают и на мазок отдельной пипеткой наносят раствор Люголя на 1-2 минуты, затем сливают.

4. Препарат помещают в стаканчик с 96% этанолом на 30 секунд (или наносят спирт из пипетки). При данном методе окраски спирт является вспомогательным (обесцвечивающим) веществом, поэтому время воздействия должно быть выдержано абсолютно точно!

5. Препарат быстро и тщательно промывают водой.

6. С препарата сливают остатки воды и отдельной пипеткой наносят раствор фуксина на 1-2 минуты.

7. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с использованием маслянно-иммерсионного объектива.

Метод окраски по Граму

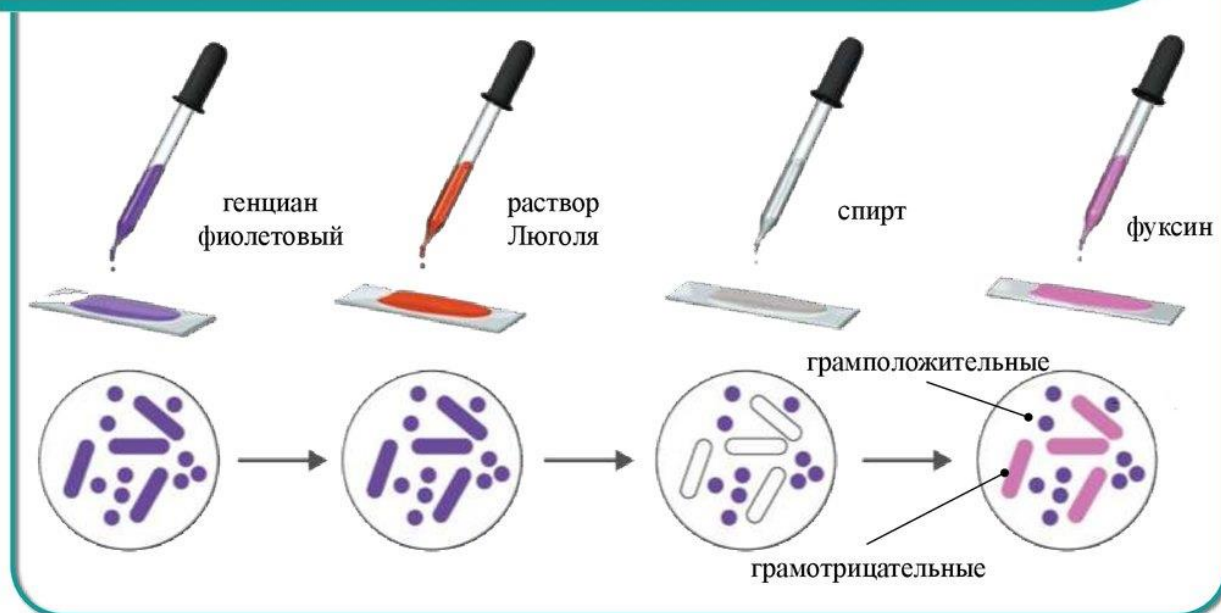


Рис.6. Последовательность нанесения веществ при окраске по Граму.

По современной классификации бактерий согласно «Определителю бактерий Берджи» грамположительные микроорганизмы относятся ко второму отделу Firmicutes (спорообразующие палочки, кокки, микобактерии и др.), грамотрицательные – к первому отделу Gracilicutes (извитые микроорганизмы, представители семейства Enterobacteriaceae, бруцеллы, риккетсии, хламидии и др.) и третьему отделу Tenericutes (микоплазмы и уреаплазмы). К обеим группам относятся как патогенные, так и условно-патогенные микроорганизмы. Примеры приведены в таблице 1.

Таблица 1. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы

Грамотрицательные бактерии — красные с тонкой клеточной стенкой	Грамположительные бактерии — сине-фиолетовые с толстой клеточной стенкой
Гонококки	Стафилококки
Менингококки	Стрептококки
Вейлонеллы	Пневмококки
Палочки (<i>Escherichia coli</i> и др.)	Палочки
Вибрионы	Бациллы
Кампилобактерии Хеликобактерии	Клостридии
Спириллы	Коринебактерии
Спирохеты	Микобактерии
Риккетсии	Бифидобактерии
Хламидии	Актиномицеты

5 Контрольные вопросы

1. Укажите значение микроорганизмов в природе.
2. Перечислите основные правила техники безопасности при работе в бактериологической лаборатории.
3. Для чего в микробиологической лаборатории готовят микропрепараты?
4. Дайте определение микропрепарата.
5. Перечислите этапы приготовления микропрепарата.
6. Опишите технику приготовления микропрепарата.
7. Для чего применяют фиксацию микропрепарата?
8. Опишите технику простого окрашивания микропрепарата.
9. Опишите технику сложного окрашивания микропрепарата.
10. Перечислите красители, применяемые при окраске по Граму.
11. Согласно современной классификации укажите отделы, к которым относятся грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы?
12. Приведите примеры грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колычев, Николай Матвеевич. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. - 3-е изд., стер. - Электрон. дан. - Санкт-Петербург : Лань, 2019. - 624 с. - (Учебники для вузов) (Специальная литература). - Внешняя ссылка: <https://e.lanbook.com/book/125742>
2. Кисленко, Виктор Никифорович. Микробиология : учебник : для студ. вузов по направл. 36.03.01 "Вет.-сан. экспертиза" / В. Н. Кисленко, М. Ш. Азаев. - М. : ИНФРА-М, 2015. - 270, [2] с. + Доп. материалы [Электронный ресурс ; Режим доступа <http://www.znaniyum.com>]. - (Высшее образование - Бакалавриат) (Бакалавриат). - Библиогр.

в конце разд.

3. Кисленко, Виктор Никифорович. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. Н. Кисленко. - Электрон.дан. - М. : Инфра-М, 2017. - 232 с. - Внешняя ссылка: <http://znanium.com/go.php?id=883955>

4. Краткий словарь микробиологических, вирусологических, иммунологических и эпизоотологических терминов [Электронный ресурс] / Р. Г. Госманов [и др.]. - Электрон. дан. - СПб.[и др.] : Лань, 2017. - 304 с. - (Учебники для вузов) (Специальная литература). - Внешняя ссылка: <https://e.lanbook.com/book/89929>

5. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. Справочник. – Москва, 2005 – С. 203 – 214.

Содержание

Введение

1. Материальное обеспечение
2. Правила работы в бактериологической лаборатории
3. Техника приготовления микропрепарата
4. Окраска микропрепарата
5. Контрольные вопросы
6. Список литературы