

**ФГБОУ ВО АМУРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ МИНЗДРАВА РОССИИ**

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ**

**Наиболее распространенные  
методы окраски бактерий**  
учебное пособие (папка-буклет)



Благовещенск, 2017 г.

УДК 579

Учебное пособие «Наиболее распространенные методы окраски бактерий» составлено заведующей кафедрой микробиологии, вирусологии д.м.н., профессором Г.И. Чубенко в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по специальности «Лечебное дело» и «Педиатрия».

Данное пособие составлено в виде папки-буклета для наиболее успешного освоения базовых методик окраски студентами II и III курсов при изучении дисциплины «микробиология, вирусология» в медицинском вузе. Для составления папки-буклета привлечены классические методики окраски мазков из патологического материала и микробных культур, а также фотографии окрашенных мазков, опубликованные в учебной литературе и находящиеся в свободном доступе в сети Интернет.

Рецензенты:

заведующая кафедрой гигиены, д.м.н., профессор Н.В. Коршунова

заведующий кафедрой биохимии д.м.н., профессор Е.А. Бородин

Утверждено Центральным координационно-методическим советом ФГБОУ ВО Амурской ГМА Минздрава России 21 декабря 2017 г., протокол № 4

## Оглавление

	Стр.
1 Введение	3
2 методика окраски по Граму	4
3 методика окраски по Нейссеру	5
4 методика окраски по Леффлеру	6
5 методика окраски по Цилю-Нильсену	7
6 методика обнаружения зерен Муха	7
7 методика окраски по Ожешки	8
8 методика окраски по Пешкову	9
9 методика окраски Бурри-Гинсу.	9
10 методика окраски по Михину	10
11 методика окраски по Здравовскому	12
12 методика окраски по Романовскому-Гимзе	12
13 методика окраски жгутиков по методу Леффлера	13
14 методика окраски серебрением по Морозову	14
15 Микроскопия живых неокрашенных клеток	14
16 Рецептатура красителей	16
17 Литература	18

## **Введение**

Для окраски бактериальных препаратов широко применяются различные методы окраски. Их применение позволяет судить о форме, размере, расположении микробных клеток, а также особенностях их химического состава. Окраска бактерий может применяться в фиксированных микробных препаратах и прижизненно.

Все методики окраски можно условно разделить на простые и сложные. Для простых методов окраски чаще используют основные анилиновые красители (основной фуксин, метиленовый синий и др.). Сложные методики окраски имеют наибольшую информативность и позволяют обнаружить или изучить строение конкретных морфологических структур бактерий.

Качество окраски мазка определяется рядом факторов: чистотой предметных и покровных стекол; свойствами микробной культуры, ее физиологической активностью, условиями культивирования; временем и характером фиксации, порядком нанесения красителей, экспозицией красителей во времени и др.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой. Фиксация мазков в клинической микробиологии необходима для снижения вирулентности исследуемой культуры и закреплении ее на поверхности стекла. Фиксация мазков чаще осуществляется в пламени горелки или жидкими фиксаторами (смесью Никифорова или 5% формалином). Смесь Никифорова представляет собой смесь в соотношении 1:1 этилового спирта 96% и эфира (сернокислого) для наркоза. Время фиксации 10-15 мин.

Фиксированные мазки, для общеморфологического изучения, погружают в растворы красителей на определенный промежуток времени, а затем промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

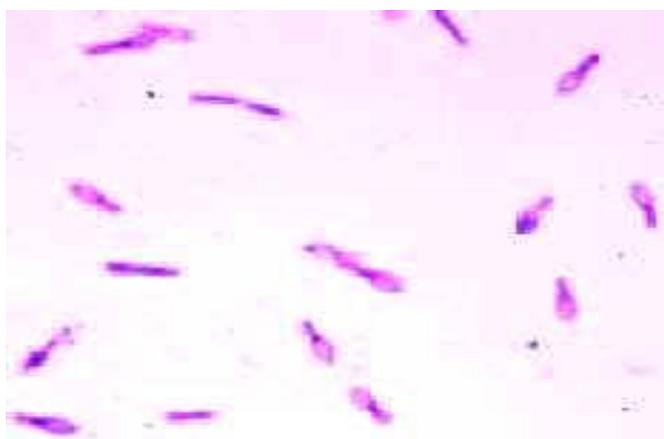
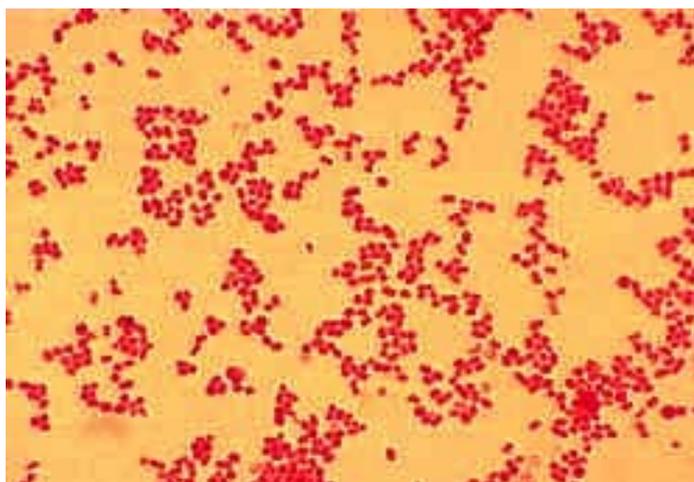
Таким образом, правильная техника приготовления мазков, приготовленных из материалов от больных, точность их окраски, позволяет поставить

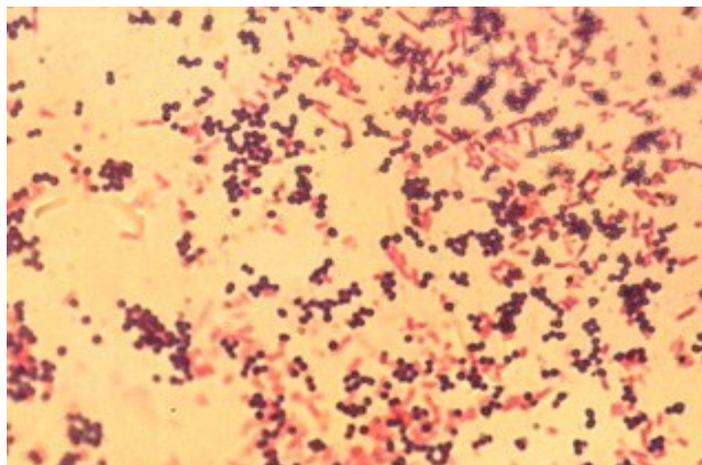
предварительный этиологический диагноз, а значит определиться с лечебной тактикой пациента.

Для изучения строения клеточной стенки бактерий применяют методику **окраски по Граму** в различных модификациях(например, Синева).

1. На фиксированный мазок наносится краситель генциан-фиолетовый в течение 1 мин.
2. Не промывая водой, наносится раствор Люголя – 30 сек.
3. Не промывая водой, нанести этиловый спирт, до прекращения отхождения фиолетовых струек краски -30 сек.
4. Промыть мазок водой.
5. Нанести водный фуксин 1-2 мин.
6. Промыть мазок водой, высушить.

Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный цвет.





### **Обнаружение включений**

Волютин —полифосфат, запасное фосфор и азотсодержащее вещество. Характерные свойства волютина — сродство к основным красителям и метахромазия, т. е. способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества. Для выявления метахроматических включений волютина в цитоплазме микробной клетки применяют методику

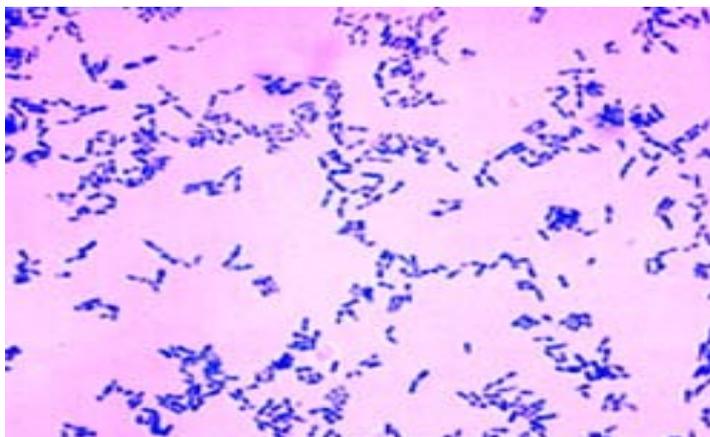
#### **окраски по Нейссеру**

1. На фиксированный мазок наливают уксуснокислую синьку Нейссера на 2-3 мин.
2. Слить краситель и нанести раствор Люголя-40 сек..
3. Промыть мазок водой.
4. Докрасить раствором везувина или хризоидина – 30 сек.
5. Промыть водой, высушить



## Методика окраски по Леффлеру

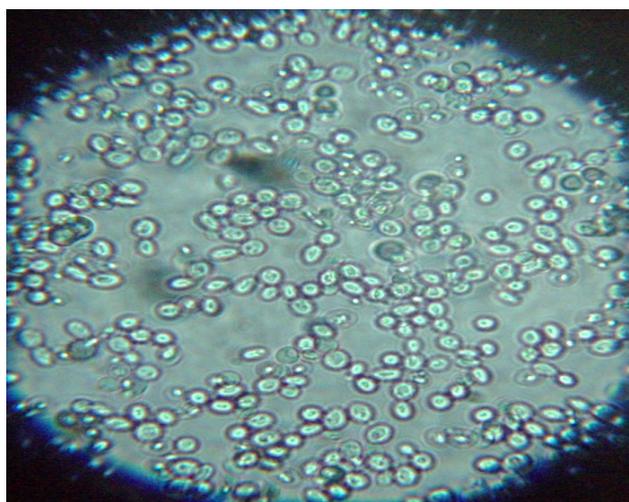
1. На фиксированный мазок наливают щелочной метиленовый синий на 3-5 мин.
2. Промывают водой
3. Высушивают, микроскопируют



## Окраска гликогена

Гликоген — углевод, животный крахмал. Встречается у эукариот и прокариот. Часто гликоген накапливается в клетках дрожжей, бацилл.

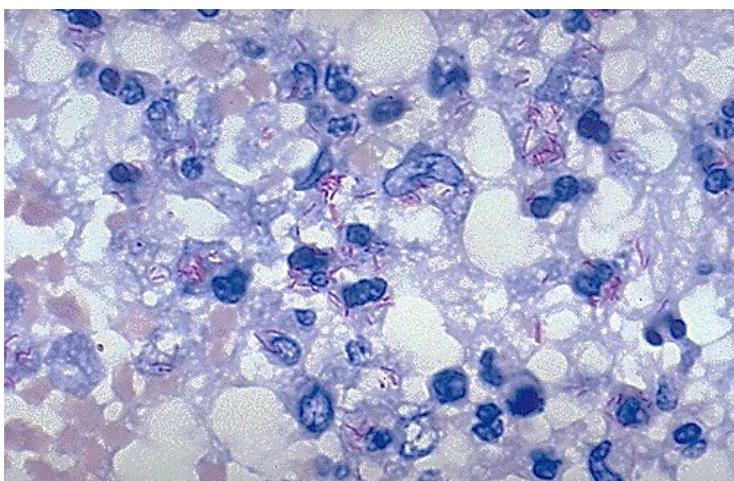
1. На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии микроорганизмов
2. К ней добавляют такую же каплю раствора I в KI (7 г I<sub>2</sub> и 20 г KI на 100—300 мл дистиллированной воды).
3. Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией.



Кислотоустойчивые бактерии обнаруживают методикой окраски

### по Цилю-Нильсену

1. Фиксированный мазок окрашивают карболовым фуксином через полоску фильтровальной бумаги с подогреванием над пламенем спиртовки /до появления паров/ 2-5 мин.
2. Снимают бумагу, и после охлаждения стекла промывают мазок водой.
3. Обесцвечивают препарат 5% серной кислотой.
4. Промывают мазок водой.
5. Окрашивают метиленовым синим 3-5 мин.
6. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.



### Методика выявления зернистой формы туберкулезных микобактерий (зерен Муха).

Препарат выдерживают сутки в смеси 10 мл насыщенного спиртового раствора метилового фиолетового и 100 мл 2% водного раствора карболовой кислоты.

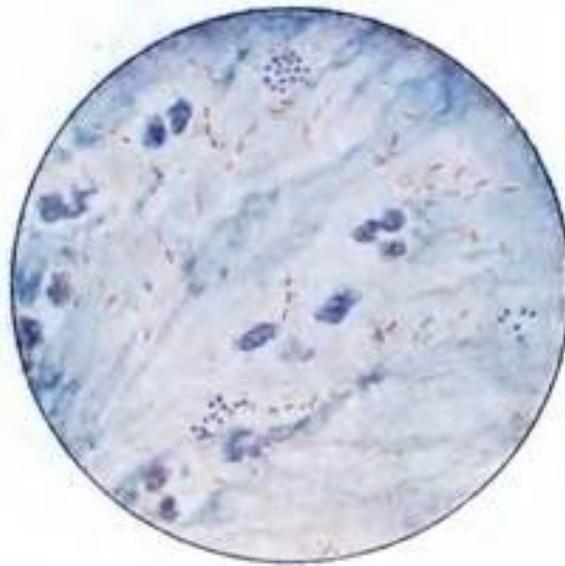
Затем его 1-2 мин обрабатывают раствором Люголя,

1 мин 5% раствором азотной кислоты

10 с – 3% раствором хлористоводородной кислоты.

После дифференцирования в смеси, состоящей из равных объемов спирта и ацетона, до прекращения отхождения краски промывают водой, докрашивают фуксином Пфейффера, вновь промывают водой и высушивают.

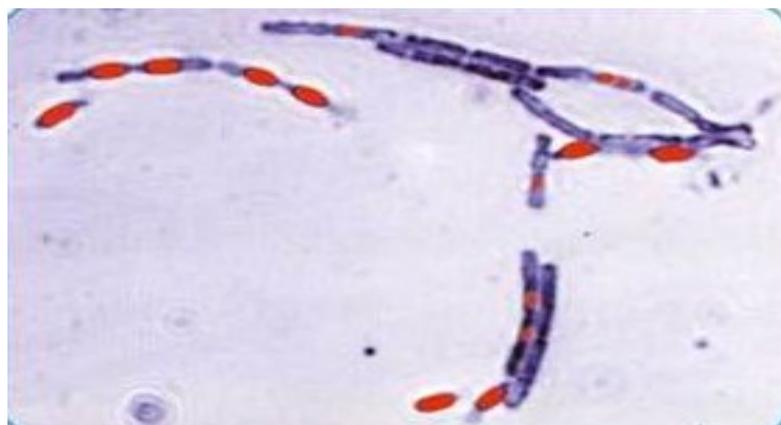
Микобактерии (зерна Муха) окрашиваются в фиолетовый цвет.



## Обнаружение спор

### Методика окраски по Ожешки

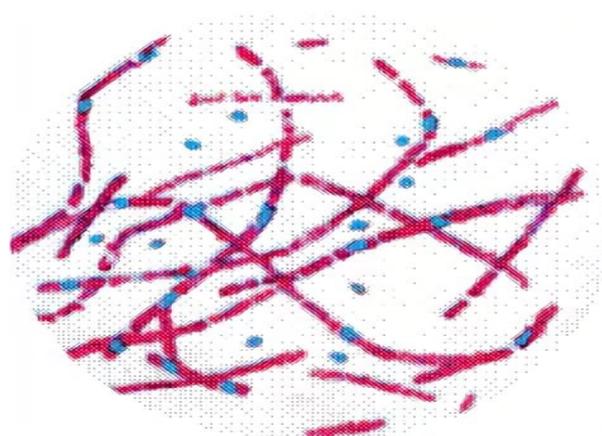
1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор соляной кислоты и подогревают в пламени спиртовки 2-3 мин.
2. Кислоту сливают, препарат промывают водой, просушивают и фиксируют над пламенем.
3. Далее препарат окрашивают по Цилю-Нильсену.  
Споры окрашиваются в розовый цвет, бациллы в синий





### Методика окраски спор по Пешкову

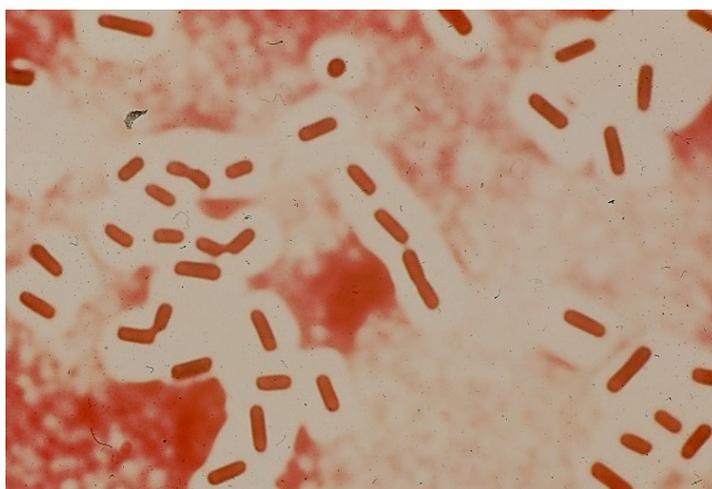
1. Мазок фиксируют в пламени горелки
  2. Наливают метиленовый синий по Леффлеру, нагревают, кипятят 15- 20 секунд.
  3. Охлаждают препарат и промывают водой
  4. Докрашивают 0,5% раствором нейтрального красного 30 секунд
  5. Промывают водой и высушивают
- Споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, бациллы в розовый.



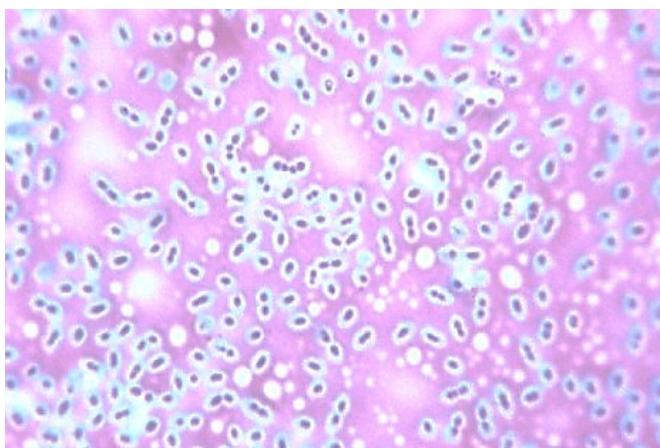
### Выявление капсул микроорганизмов:

#### Методика окраски Бурри-Гинсу.

1. Смешать каплю микробной взвеси с каплей туши.
2. Нанести смесь на предметное стекло. Распределить смесь по стеклу при помощи другого стекла со шлифованным краем (под углом 45°).
3. Мазок высушить. Зафиксировать.
4. Докрасить водным фуксином в течение 1-2 мин.
5. Промыть водой, высушить на воздухе, микроскопировать.

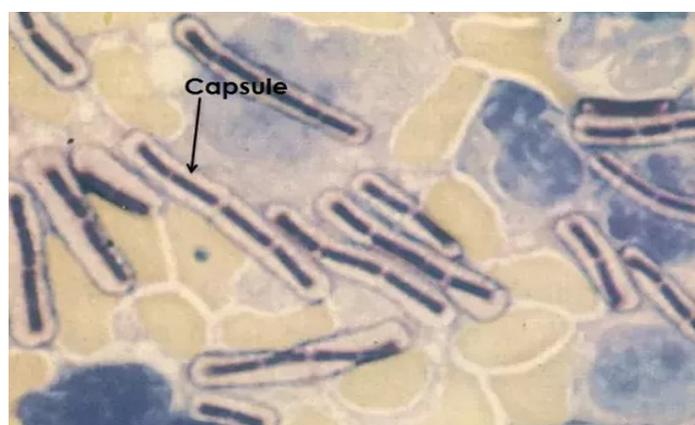


Капсула при окраске по Граму



### Методика окраски по Михину

Фиксированный мазок (преимущественно из крови) окрашивают метиленовой синькой Леффлера в течение 2—3 минут при подогревании (до появления паров). Затем краску быстро смывают водой и мазок высушивают. Лучше окрашивать старым раствором краски. Микроскопическая картина: капсулы — светло-розовые, бактерии — темно-синие.



### **Методика окраски по Здрадовскому (риккетсий).**

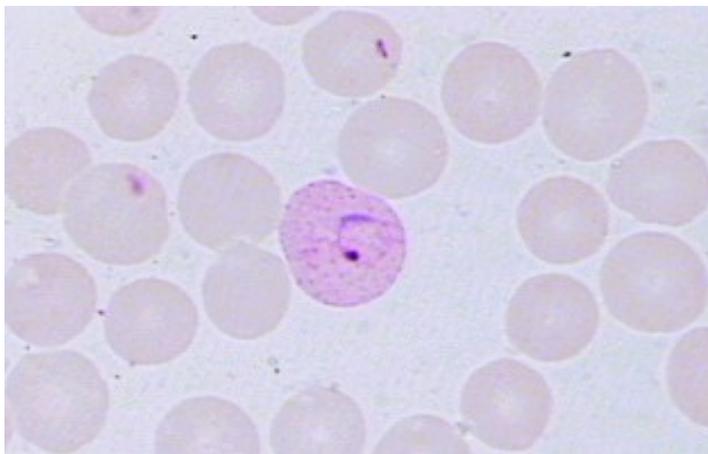
1. Водный фуксин – 5 мин.
2. Промыть водой.
3. Обработать 0,01% HCl.
4. Промыть водой.
5. Окрасить метиленовым синим - 1 мин.
6. Промыть водой.

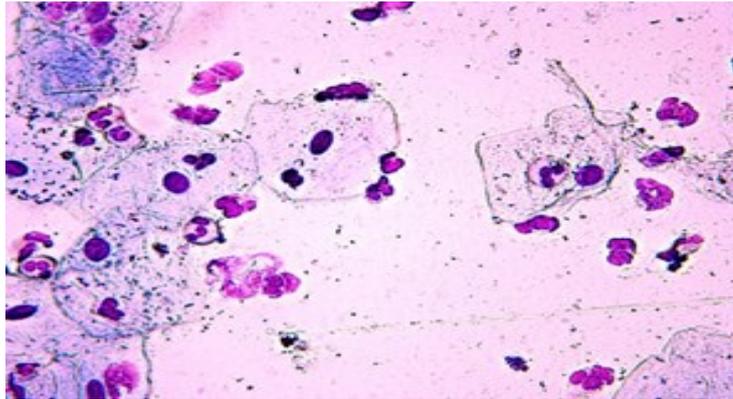


### **Методика окраски по Романовскому-Гимзе**

1. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом 3 минуты.
  2. Снова высушивают и окрашивают.
- Окраску по Романовскому-Гимзе производят в течение 20-30 минут.
3. Затем промывают, высушивают и микроскопируют

Цитоплазма простейших окрашивается в голубой цвет, ядра- в красный.



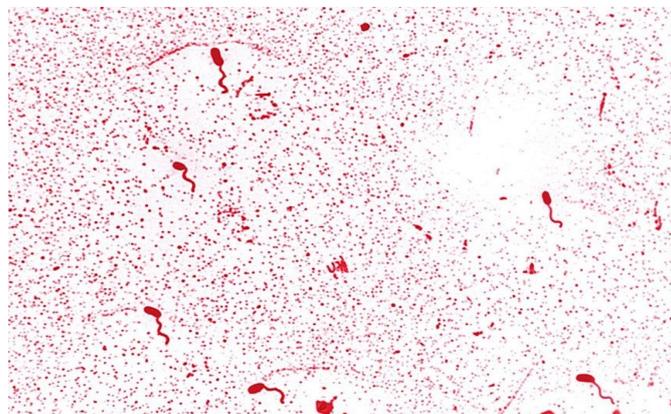


### **.Методы окраски жгутиков бактерий**

В основе методов окрашивания жгутиков лежит обработка их протравителями, в результате которой они увеличиваются в объеме. Прежде чем приступить к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висячей капле.

#### **Методика окраска жгутиков по методу Леффлера**

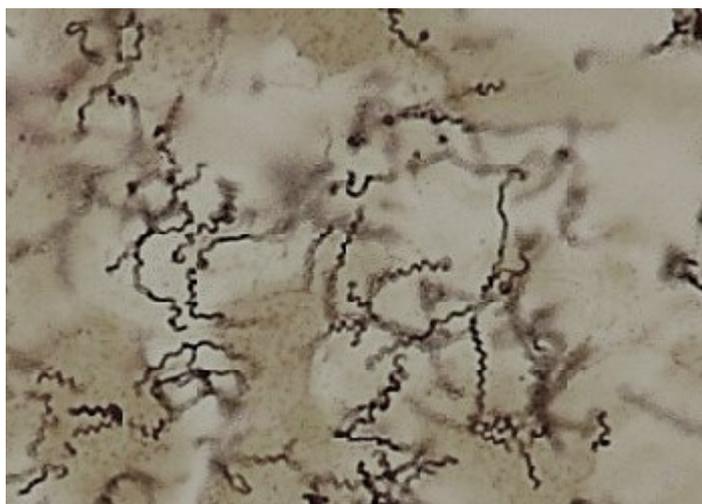
1. Микробную культуру вносят в 1 мл стерильной водопроводной воды. Через 20 минут каплю микробной суспензии наносят на стекло и высушивают на воздухе.
2. Препарат протравливают в течение 15 мин. (состав протравы: 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина; 10 мл 25% водного раствора танина; 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа)
3. Препарат промывают водой
4. Окрашивают фуксинов Циля, разведенным водой 1:1 в течение 5 мин. при небольшом нагревании.
5. Промывают водой, высушивают



## **Методика окраски серебрением по Морозову**

1. Нефиксированный мазок помещают в стакан с дистиллированной водой и фиксируют раствором № 1, одну мин.
2. Препарат вынимают из стакана, промывают водой, протравливают раствором № 2 и нагревают до появления паров, 1 мин.
3. Мазок промывают водой, после чего окрашивают раствором № 3, прогревая его до появления темно-коричневой окраски, 1-2 мин.

При таком способе окрашивания микроорганизмы приобретают темный цвет.



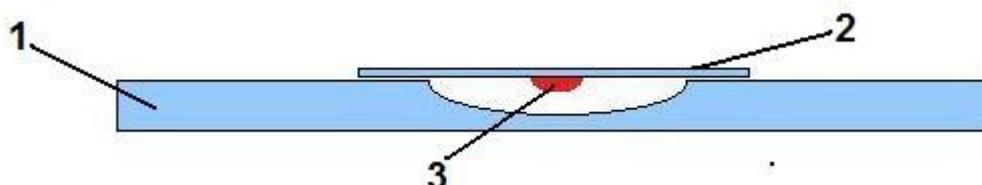
Нативные препараты чаще всего готовят для исследования живых неокрашенных бактерий в целях установления их подвижности. Движение бактерий за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя светлпольный микроскоп с приспущенным конденсором, либо исследовать в темном поле и с помощью фазово-контрастного микроскопа.

### **Микроскопия живых неокрашенных клеток**

При фазово-контрастной микроскопии мы будем наблюдать подвижность и форму бактерий темного цвета на светлом фоне. При темнопольной микроскопии – подвижность и форму бактерий светлого цвета на темном фоне.

Техника приготовления мазков из живых неокрашенных клеток: висючая капля и раздавленная капля. Микроскопия живых клеток позволяет изучать бактерии в неизменном виде и обнаруживать подвижность. У крупных бактерий возможно просматривание более тонкой структуры. При микроскопии живых микроорганизмов, следует предпринимать определенные меры предосторожности.

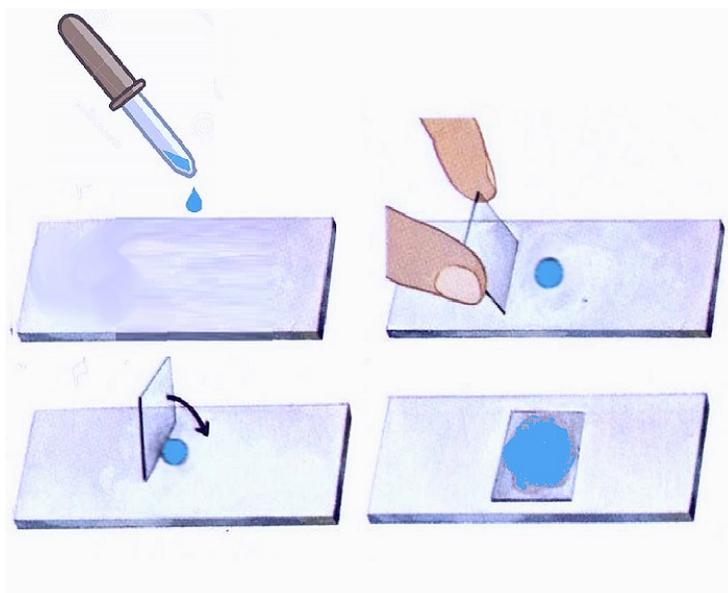
**Висячая капля.** Для этого метода применяют предметные стекла, которые имеют углубления в середине. Каплю наносят на покровное стекло и сверху накрывают предметным стеклом углублением над каплей. Перед этой процедурой предметное стекло недалеко от углубления смазывают вазелиновым маслом. После этого препарат совмещенных стекол быстро переворачивают, чтобы покровное стекло было наверху. Препарат микроскопируют в темном поле.



1. Предметное стекло
2. Покровное стекло
3. Микробная взвесь

**Раздавленная капля.** На предметное стекло наносят каплю исследуемого материала и накрывают покровным стеклом. Капля не должна выходить за края покровного стекла.

Возможно окрашивание таких препаратов 0,001 % раствором метиленовой синей или нейтрального красного. Для микроскопирования применяют предметные стекла толщиной 1-1,5 мм, а покровные толщиной - 0,15-0,2 мм.



## Рецептура красителей

### Кристаллический фиолетовый

Кристаллический фиолетовый – 2 гр.  
Этанол 96% - - 20 мл  
Щавелевокислый аммоний 1% водный - 80 мл.  
Выдерживают перед применением 48 часов.

### Метиленовый синий (по Лефлеру)

Метиленовый синий солянокислый - 1,6 гр  
Этанол 96% - 100 мл  
КОН 0,01% водный - 100 мл

### Метиленовый синий насыщенный раствор

Метиленовый синий – 9 гр.  
Этанол 96% - 100 мл

### Фуксин основной

Фуксин основной – 2 гр  
Этанол 96% - -100 мл  
Глицерин - 1 мл

### Фуксин карболовый (феноловый)

Основной фуксин- 0,3 гр  
Этанол 96% - -10 мл  
Фенол кристаллический (расплавленный при нагревании) - 5 мл  
Дистиллированная вода- 95 мл

### Фуксин Циля

Карболовый фуксин – 5 мл  
Дистиллированная вода- 95 мл

### Раствор Люголя

Йод кристаллический - 1 гр.  
Калий иодид - 2 гр.  
Вода дистиллированная- 300 мл

### Синька Нейссера

метиленовый синий - 1 гр.  
Этанол 96% - - 20 мл.  
80% уксусная кислота - 50 мл  
Дистиллированная вода - 950 мл

### Везувин

Везувин - 2 гр.  
Этанол 96% - -60 мл  
Дистиллированная вода - 40 мл

### **Хризоидин**

Хризоидин -1 гр  
Кипящей дистиллиров. воды- 300 мл

### **Романовского- Гимзы**

Коммерческий краситель (порошок)- 7 гр  
Метанол - 750 мл  
Глицерин - 256 мл  
Перед применением к 10 мл дистиллированной воды добавляют 10 капель краски.

### **Краситель Морозова:**

Раствор № 1 (жидкость Рунге):  
ледяная уксусная кислота - 1 мл  
формалин 40 % - 2 мл  
дистиллированная вода - 100 мл

Раствор № 2 (протрава):  
танин - 5 г  
карболовая кислота жидкая - 1 мл  
дистиллированная вода - 100 мл

Раствор № 3 (краситель):  
азотнокислое серебро (нитрат серебра) - 5 г  
дистиллированная вода - 100 мл

Отливают 20 мл в другой сосуд, к оставшимся 80 мл раствора по каплям добавляют раствор аммиака, пока не растворится образующийся осадок и не останется легкая опалесценция; Для окраски препарата раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

## Литература:

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии.
2. А.А. Воробьев, В.В. Зверев, А.С. Быков.- М.: МИА.- 2008. -272 с.
3. Д.А. Васильев А.А. Щербаков Л.В. Карпунина С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко. Методы общей бактериологии Учебно-методическое пособие. Ульяновской ГСХА. - 1998.
4. А.С.Лабинская, Н.Н.Костюкова, С.М.Иванова. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. М.: Издательство БИНОМ. - 2012. -1152 с.
5. Методы общей бактериологии (в трех томах). Под ред. Ф.Герхардта и др. Москва: Мир.- 1983.
6. Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко, Л.М. Васильева // Физиологическое состояние дрожжей. Учебное пособие.- Санкт-Петербург.-2013.- 45 с.
7. <https://studopedia.ru/>